

Hely Ollila

Tiloronin vaikutukset mesotelioomasoluissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.11.2015

Tekijä Otsikko	Hely Ollila Tiloronin vaikutukset mesotelioomasoluissa
Sivumäärä Aika	41 sivua 10.11.2015
Tutkinto	Bioanalytiikka
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Hannele Pihlaja Dosentti Katri Koli
<p>Mesotelioomakasvain saa alkunsa vatsakalvolta, keuhkopussista tai sydänpussista. Keuhkopussin mesoteliooma on keuhkopussin eli pleuran syöpäsairaus, johon perinteiset syövänhoitomenetelmät tehoavat heikosti. Rakentamisessa etenkin 1960- ja 1970-luvuilla käytetty asbesti on tunnettu riskitekijä pleuramesoteliooman synnyssä. Mesoteliooman latenssiaika on pitkä, jopa useita vuosikymmeniä, jonka vuoksi uusia mesotelioomia paljastuu vuosittain, vaikka asbestin käyttö kiellettiin Suomessa 1990-luvulla. Mesotelioomakasvain on usein aggressiivinen ja sen kasvu on invasiivista eli ympäröiviin kudoksiin tunkeutuvaa.</p> <p>Katri Kolin tutkimusryhmä Helsingin yliopistossa tutkii keuhkofibroosia ja mesotelioomaa. Näiden sairauksien taustalla on samanlaisia kasvutekijöiden epänormaaliin ilmentämiseen liittyviä mekanismeja. Tutkimusryhmä havaitsi tiloroni-nimisen lääkeaineen estävän fibroosia kokeellisessa hiirimallissa. Lisäksi tiloronin nähtiin normalisoivan sairauden muuttamia BMP- ja TGF-β-kasvutekijäaktiivisuuksia keuhkoepiteelisoluissa. Tulosten innoittamana haluttiin tutkia tiloronin vaikutuksia myös mesotelioomasoluissa.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin tiloronin vaikutusta TGF-β- ja BMP-kasvutekijäreittien aktiivisuuteen ja greliini- sekä BMP-geenien ilmenemiseen mesotelioomasoluissa. Työn tarkoituksena oli saada tietoa tiloronin vaikutuksista mesotelioomasoluissa. Käytettyjä tutkimusmenetelmiä olivat soluviljely, transfektio, kasvutekijäaktiivisuuskokeet, RNA-eristys ja kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR. Kokeellisessa työssä tutkittiin kolmea kaupallista mesotelioomasolulinjaa.</p> <p>Kahdessa tutkitussa mesotelioomasolulinjassa tiloroni vähensi ja yhdessä lisäsi BMP-aktiivisuutta. TGF-β-aktiivisuutta tiloroni näytti lisäävän. Ryhmän aiemmissa tutkimuksissa tiloroni lisäsi BMP- ja vähensi TGF-β-aktiivisuutta keuhkoepiteelisoluissa. Tiloronilla ei siis havaittu olevan samanlaisia vaikutuksia mesotelioomasoluissa kuin sillä oli aiemmin tutkituissa keuhkoepiteelisoluissa. Tämän lisäksi opinnäytetyössä tiloronin nähtiin lisäävän greliini-nimisen proteiinin ilmentymistä kohdesoluissa. Tutkimusryhmän aiempien tulosten valossa greliinin ilmentyminen on linkattu vahvasti mesoteliooman invaasioon. Näin ollen tiloronia ei voida pitää tehokkaana invaasion estäjänä.</p>	
Avainsanat	mesoteliooma, tiloroni, greliini, TGF- β , BMP

Author Title	Hely Ollila The Effects of Tilorone in Mesothelioma Cells
Number of Pages Date	41 pages 10 November 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Katri Koli, Docent
<p>Mesothelioma is a form of cancer located in pleura, peritoneum or pericardium. Mesothelioma located in pleura is usually caused by asbestos exposure. The mesothelioma tumor is aggressive, and conventional cancer therapies take a poor effect on it.</p> <p>The purpose of my study was to investigate the effects of tilorone on mesothelioma cells. The aim of my study was to find out if tilorone had an effect on growth factor activities (such as TGF-β and BMPs) and if tilorone could be a good inhibitor of invasion. Tilorone is a molecule that is known as a viral drug. The theoretical background of my study was based on the researches into pleural mesothelioma and lung fibrosis carried out by a research group led by Katri Koli at the University of Helsinki, Finland. The research group discovered that tilorone reduced fibrosis in an experimental mouse model. Moreover, the research group found out that certain growth factor activities (such as TGF-β and BMPs) changed in fibrosis and mesothelioma. Likewise, the expression of protein called gremlin increased in the mesothelioma tumor tissue. Gremlin expression was linked to the invasion of mesothelioma.</p> <p>The methods of my study were cell culture, transfection, growth factor activity tests, RNA extraction, cDNA-synthesis and quantitative Real Time PCR. I examined three mesothelioma cell lines. Mesothelioma cells were cultured in 5% CO₂ incubator on Petri dishes. They were divided on multiwell cell culture plates for the examination.</p> <p>As for the results, tilorone did not have the same effects on mesothelioma cells as it had on lung epithelial cells. Tilorone seemed to increase the activity of TGF-β and reduced the activity of BMPs in two mesothelioma cell lines. In one mesothelioma cell line, tilorone increased the activity of BMPs. However, the earlier results of the Koli research group were almost the opposite. Tilorone increased the expression of gremlin. Thus, tilorone cannot be considered as a good inhibitor of invasion.</p>	
Keywords	mesothelioma, tilorone, gremlin, TGF- β , BMP

Opinnäytetyössä esiintyviä käsitteitä ja lyhenteitä

Antagonisti = reseptorinsalpaaja. Antagonisti sitoutuu kohdereseptoriinsa ja salpaa sen niin, ettei mikään muu reseptorille luontainen molekyyli pääse aktivoimaan sitä.

BMP = engl. Bone Morphogenetic Protein, luun morfogeneettinen proteiini, kasvutekijä. Aktivoi mesoteliomisoluihin transfektoitua Bre_2 -promoottoria.

cDNA = komplementaarinen DNA, tarkoittaa yksijuosteisesta lähetti-RNA:sta käänteiskopioijaentsyymien avulla muokattua kaksijuosteista (c)DNA-molekyyliä.

Ct = engl. Threshold Cycle, kynnysarvokierros.

Ekspressio = geenin ilmentyminen.

EMT = epiteeli-mesenkyymin transito, tarkoittaa epiteelisolujen muuttumista mesenkymaalisiksi soluiksi pahanlaatuisessa taudissa (esim. fibroosi tai syöpä).

Endogeeninen = sisäsyntyinen. Endogeeninen aine on sellainen, jota tarkasteltava eliö voi tuottaa luonnostaan.

FBS = engl. Fetal Bovine Serum, nuoren vasikan seerumia, käytetään soluviljelyssä solujen kasvuolosuhteiden parantamiseksi.

Komplementaarisuus = yksijuosteiselle nukleiinihapolle vastakkainen emäsjärjestys.

Nukleiinihappo = DNA tai RNA.

Pasaasi = soluviljelmän vaihe. Kun juuri eristetty, primaari soluviljelelmä jaetaan uudelle jatkomaljalle, siitä tulee pasaasia yksi, seuraavassa jaossa pasaasia kaksi ja niin edelleen.

PBS = engl. Phosphate-buffered saline, tutkimustyössä yleisesti käytetty reagenssi.

PLB = engl. Passive Lysis Buffer, hajotuspuskuri kasvutekijäaktiivisuussmittauksissa.

Pleura = keuhkopussi.

Promoottori = alue DNA-sekvenssissä, johon polymeraasientsyymi kiinnittyy ja geenin luenta käynnistyy.

qPCR = kvantitatiivinen PCR (eli polymeraasiketjureaktio), jossa monistetaan DNA:ta ja uusien DNA-kopioiden muodostumista seurataan reaaliaikaisesti.

RLT = hajotuspuskuri RNA-eristyksessä silikapylväsmenetelmällä.

RLU = engl. Relative Light Unit, kemiluminesenssin mittaamisessa käytetty yksikkö.

RPE = pesupuskuri RNA-eristyksessä silikapylväsmenetelmällä.

RW1 = pesupuskuri RNA-eristyksessä silikapylväsmenetelmällä.

Sekvenssi = DNA- tai RNA-juosteen emäsjärjestys.

TBP = engl. TATA binding protein. Kontrolligeeni, jonka ilmentyminen solussa on vakaata riippumatta solulle tehdystä käsittelystä.

Templaatti = DNA/RNA-mallijuoste.

TGF- β = transformoiva kasvutekijä β . Aktivoi mesotelioomasoluihin transfektoitua (CAGA)₁₂-promoottoria.

Transfektio = nukleiinihappojen (DNA/RNA) viemistä solun sisään.

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Mesoteliooma	3
2.1	Gremlini, BMP:t ja TGF- β	3
2.2	Epiteeli-mesenkyymi transito	4
3	Tiloroni lääkeaineena	5
4	Menetelmät	6
4.1	Soluviljely	6
4.1.1	Steriili ympäristö	7
4.1.2	Aseptinen käytäntö	8
4.1.3	Ravintoliuos eli medium	9
4.1.4	Kontaminaation riski	11
4.2	Kasvutekijäaktiivisuuksien mittaaminen	13
4.2.1	Transfektio	13
4.2.2	Lusiferaasimittaus	15
4.3	Geeniekspressioiden mittaaminen	19
4.3.1	RNA-eristys	19
4.3.2	RNA:n puhtaus	20
4.3.3	cDNA-synteesi	21
4.3.4	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	21
5	Työn toteutus	24
6	Tulokset	27
6.1	Kasvutekijäaktiivisuuskokeet	27
6.2	Geeniekspressiokokeet	30
7	Yhteenveto	33
7.1	Tulosten tulkintaa	34
7.2	Johtopäätökset ja tulevaisuudennäkymiä	35
7.3	Työn luotettavuus ja eettisyys	36
	Lähteet	38

1 Johdanto

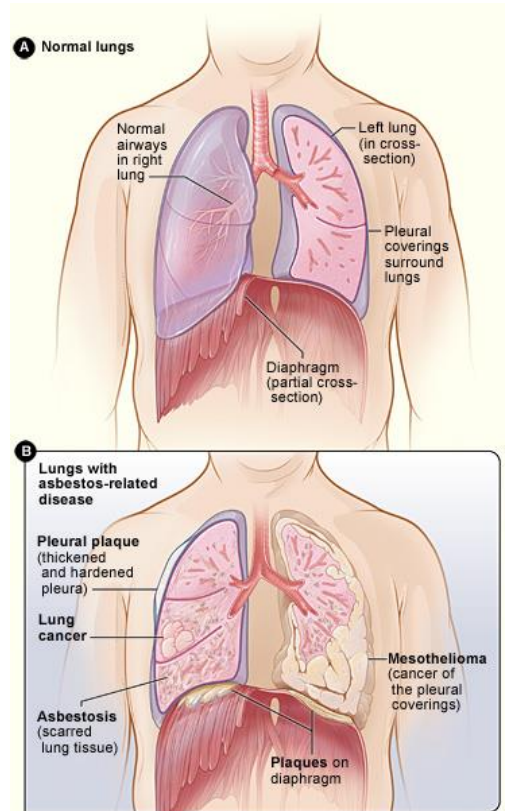
Tämä opinnäytetyö toteutettiin dosentti Katri Kolin tutkimusryhmässä Helsingin yliopistossa osana Kolin ryhmän tekemää biolääketieteellistä tutkimusta. Työn tarkoituksena oli selvittää tiloroni-nimisen lääkeaineen vaikutuksia mesotelioomasoluissa. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat Metropolia Ammattikorkeakoulun lehtori Hannele Pihlaja ja tutkimusryhmän johtaja dosentti Katri Koli.

Kolin tutkimusryhmä Biomedicumissa kuuluu lääketieteellisen tiedekunnan translationaalisen syöpäbiologian tutkimusohjelmaan. Translationaalinen tutkimus muodostaa yhteyden perustutkimuksen ja potilaan hoidon välille. Translationaalisella tutkimuksella saadaan nopeammin hyödynnettyä tutkimustuloksia diagnostiikassa ja kliinisissä sovellutuksissa. Lisäksi kliinisestä potilaan hoidosta saadut kokemukset ja näyttemateriaali hyödyttävät tutkimuksen tekemistä. (Hiltunen. Translationaalinen tutkimus, mitä, miksi, miten?)

Kolin ryhmä tutkii kasvutekijöiden merkitystä keuhkofibroosin synnyssä sekä gremlinin merkitystä mesoteliooman invasiivisessa kasvussa. Invasiivisuus tarkoittaa kasvaimen kykyä tunkeutua ympäröiviin kudoksiin (Duodecim. Terveyskirjasto. Lääketieteen sanasto. s.v. invasiivinen). Tutkimuksessa etsitään tehokasta hoitomuotoa keuhkofibroosin ja mesotelioomaan (Tähtäimessä tehokas hoito keuhkofibroosiin ja mesotelioomaan. 2006). Tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää, miten kasvutekijät säätelevät solujen kasvua ja erilaistumista. Erityisesti kiinnostavia ovat transformoivan kasvutekijä β :n (TGF- β) ja luun morfogeneettisten proteiinien perheeseen kuuluvien kasvutekijöiden (BMP:t) toiminta ja aktiivisuus solun normaalissa toiminnassa sekä syövän ja fibroosin synnyssä. (Koli 2006.)

Idiopaattinen keuhkofibroosi on vaikeasti hoidettava ja nopeasti etenevä sairaus, joka aiheuttaa keuhkokudoksen arpeutumista, eli normaalin keuhkoparenkyymin korvautumista sidekudoksella. Taudin syntymekanismia ei täysin tunneta ja tällä hetkellä ainoa tiedossa oleva hoitomuoto on keuhkonsiirto. (Koli ym. 2006.) Normaalikudoksen korvauminen sidekudoksella saa aikaan sen, että keuhkojen kyky hapettaa verta alenee, mikä puolestaan aiheuttaa taudin edetessä pahenevan hengenahdistuksen (Mustajoki 2014).

Keuhkopussin mesotelioma on lähinnä asbestin aiheuttama keuhkopussin eli pleuran syöpäsairaus (Sankila – Pukkala 2009). Asbestiksi kutsutaan luonnossa esiintyviä kuitumaisia siliikaattimineraaleja. Palamattomuuden, kestävyiden sekä hyvän kosteuden- ja lämmöneristämiskyvyn takia asbestia on hyödynnetty paljon rakentamisessa, Suomessa erityisesti 1960–1970-luvuilla. Eri rakennusmateriaaleihin sidottuna asbesti ei aiheuta terveydelle haittaa, mutta asbestia sisältävien rakenteiden purkamisen on kuitenkin todettu olevan suuri terveysriski, ja siitä syystä asbestin valmistaminen ja maahantuonti kiellettiin Suomessa vuonna 1993. Kun purkutyötä tehdään, asbestia sisältävät rakennusmateriaalit hajoavat ja hengitysilmaan joutuu haitallista kuitumaista asbestipölyä, joka hengityksen mukana kulkeutuu keuhkoihin, jossa se aiheuttaa mesotelioman lisäksi muun muassa asbestoosia, keuhkosyöpää ja muita keuhkopussin sairauksia (Anttila – Huuskonen – Oksa – Tossavainen – Vehmas 2006). Tästä syystä purkutoimenpiteet ovat nykyään tarkasti lain mukaan säädeltyjä ja ne tulee toteuttaa ammattilaisen toimesta määrättyjen ohjeiden mukaan. Purkutyötä tekevien terveydentilaa on myös seurattava säännöllisesti. (Kropsu – Oksa – Ylioinas 2012.)



Kuvio 1. Asbestin aiheuttamat keuhkosairaudet. (NIH. 2011.)

Vaikka tämä vakava terveysriski tiedostetaan, purkutyötä tekevien altistus pyritään minimoimaan ja heidän terveydentilaansa seurataan, paljastuu silti uusia asbestialtistuksen aiheuttamia keuhkopussin mesoteliomia vuosittain, 1990-luvun puolivälistä lähtien noin 70 tapausta vuodessa (Anttila ym. 2006). Maligni (pahanlaatuinen) mesoteliomakasvain on usein aggressiivinen ja perinteiset syövänhoitomenetelmät kuten kemo- ja radio-terapia tehoavat siihen heikosti. Nämä ominaisuudet tekevät sen hoidosta haastavaa ja siitä syystä uusia sairauden seurantaa helpottavia markkereita sekä mahdollisia uusia tehoavia lääkeaineita tarvitaan. Lisäksi mesotelioman latenssiaika on pitkä, jopa useita vuosikymmeniä, jonka vuoksi on ennustettavissa, että tulevaisuudessa mesoteliomata-paukset tulevat vain lisääntymään. Tämä lisää entisestään tarvetta toimiville sairauden seuranta- ja hoitomuodoille. (Tamminen ym. 2013.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada uutta tutkimustietoa tiloronin vaikutuksista mesotelioomasoluissa. Tarkoituksena oli erityisesti tarkastella tiloronin vaikutuksia TGF- β - ja BMP-kasvutekijöiden signalointireitteihin ja tutkia sen vaikutusta eräisiin kohdegeeneihin. Mahdollisissa jatkotutkimuksissa oli aikomus katsoa myös tiloronin vaikutuksia mesoteliooman invasiiviseen kasvuun kollageenissa (Koli 2015a). Näin ollen tutkimuskysymykset ovat:

1. Sääteleeö tiloroni TGF- β ja/tai BMP-aktiivisuutta mesotelioomasoluissa?
2. Estääö tiloroni mesotelioomasolujen kasvua, liikkumista tai invasiivista kasvua?

2 Mesoteliooma

Keuhkopussin syövän eli mesoteliooman nimitys juontaa juurensa sanasta mesoteeli, joka tarkoittaa ruumiinontelon kalvoja peittävää kudosta (MOT Kielitoimiston sanakirja 8.5c. s.v. mesoteeli). Maligni mesotelioomatuumori saa alkunsa joko keuhkopussista, vatsakalvolta tai sydänpussista (Tamminen ym. 2013). Asbestialtistus on tunnettu riskitekijä varsinkin keuhkopussissa olevan mesoteliooman synnyssä. Terveydelle haitalliset asbestikuidut kulkeutuvat hengityksen välityksellä hengitysilmosta keuhkoihin, jossa ne aiheuttavat muutoksia keuhkokudoksen soluihin.

2.1 Grekliini, BMP:t ja TGF- β

Kolin ryhmä on tutkinut keuhkoihin joutuneen asbestin aiheuttamien sairauksien mekanismeja. Eräs keskeinen löydös on grekliini-niminen proteiini, joka on BMP (luun morfogeneettinen proteiini) antagonisti. Se estää BMP2, -4 ja -7 toimintaa. BMP-perheen proteiinit ovat tärkeitä solun normaalin kasvun ja erilaistumisen säätelijöitä. Esimerkiksi hiiren munaisten ja keuhkojen normaalissa kehityksessä edellä kuvattu Grekliini-1-BMP-antagonismi on välttämätön. Hiiret, joilla grekliini-1:tä on liian vähän, kuolevat ennen syntymää keuhkojen ja munuaisten kehityshäiriöihin. Aikuisella yksilöllä, niin hiirillä kuin ihmisilläkin, grekliiniä esiintyy kuitenkin vain vähän. Viimeisimmät tutkimukset osoittavat, että monissa epiteelilähtöisissä syövässä, kuten keuhkokarsinoomassa, grekliiniä

esiintyy ylimäärin. Myös Kolin ryhmän tulokset osoittavat, että mesotelioomatuumorikudoksessa on havaittavissa grekliiniä enemmän kuin normaalissa keuhkokudoksessa. (Tamminen ym. 2013.)

Grekliini-1:n rooli malignissa tuumorikudoksessa on monimutkainen ja se toimii todennäköisesti BMP-riippuvaisten ja BMP:stä riippumattomien toimintojen välittämänä. Kolin ryhmän tutkimustulosten mukaan grekliinin esiintyminen sijoittuu erityisesti mesotelioomasolujen sisälle ja ympärille. Eräs keskeinen löydös tutkimuksessa on grekliinin kanssa vuorovaikutuksessa oleva proteiini fibrilliini-2. Fibrilliini-2:n korkea immunoreaktiivisuus liittyy Kolin ryhmän tutkimustulosten mukaan myös mesotelioomaan. Fibrilliinit ovat suuria solunulkoisia glykoproteiineja, jotka säätelevät kasvutekijöiden signalointia. Tuumorikudoksessa grekliini voi sitoutua fibrilliini-2:een ja usein ne lokalisoituvat lähelle toisiaan. (Tamminen ym. 2013.)

On siis todettu, että grekliini estää BMP-kasvutekijöiden toimintaa mesotelioomakudoksessa, mutta samaan aikaan sen ajatellaan vahvistavan TGF- β -kasvutekijän signalointia. TGF- β eli transformoiva kasvutekijä β on sytokiini, joka säätelee useita keuhkojen fysiologisia prosesseja, jotka liittyvät keuhkojen homeostaasin säilyttämiseen. Näistä esimerkkejä ovat muun muassa solun kasvu ja erilaistuminen sekä solunulkoisen väliaineen tuottaminen ja hajottaminen. Se on hyvin tunnettu profibroottinen molekyyli, jota esiintyy runsaasti fibroottisissa keuhkoissa. (Leppäranta – Tikkanen – Bespalov – Koli – Myllärniemi 2013b.)

2.2 Epiteeli-mesenkyymi transito

Epiteeli on ihon ja limakalvojen pintaa verhoava kerros (KOTUS Kielitoimiston sanakirja 2014. s.v. epiteeli). Epiteeli-mesenkyymi transito (EMT) tarkoittaa epiteelisolujen muuttumista mesenkymaaliseksi soluiksi. EMT voi olla joko kokonaisvaltaista tai osittaista. Osittaisessa EMT:ssa epiteelisolut menettävät joitain niille tyypillisiä piirteitä ja samanaikaisesti omaksuvat joitain mesenkymisoluille tyypillisiä piirteitä. EMT on välttämätön embryogeneesin eli sikiönkehityksen aikana kun uudet kudokset muotoutuvat ja lisäksi se on keskeinen tekijä selkärankaisten monien rakenteiden muodostumisessa. EMT voi olla kuitenkin myös patologista. Esimerkiksi TGF- β ja jotkut BMP-isomuodot ovat tärkeitä epiteeli-mesenkyymi transition aikaansaajia. (Tamminen 2014.)

Epiteelisoluja ja mesenkymaalisia soluja vertailtaessa epiteelisolut ovat morfologialtaan mukulakivimäisiä, paikallaan olevia ja ei-invasiivisia. Syöpäsolut, joilla on mesenkymaalinen fenotyyppi, puolestaan liikkuvat, ovat invasiivisia ja muodoltaan pitkulaisia sekä kemikaaleille, apoptoosille ja vanhenemiselle resistenttejä. Nämä solut ovat osana syövän ja fibroosin kehittymistä. (Tamminen 2014.)

Patologinen EMT edistää elinten fibrotisoitumista ja syövän kehittymistä erilaisten mekanismien kautta. Se saa soluissa aikaan invasiivisia piirteitä ja resistenssin hoitoon suunnitelluille kemikaaleille. Patologinen EMT myös edistää syöpäsolujen leviämistä ja etäpesäkkeiden lähettämistä. Kolin ryhmässä tehdyn väitöskirjan tulosten mukaan patologinen EMT on merkittävä tekijä asbestialtistuksen seurauksena kehittyvien sairauksien, kuten keuhkopussin mesoteliooman synnyssä. Mesotelioomassa EMT-fenotyyppiä pidetään huonon ennusteen merkinä. (Tamminen 2014.)

3 Tiloroni lääkeaineena

Tiloroni on vesiliukoinen, eläinkokeissa ei-toksinen, aiemmin viruslääkkeenä tunnettu lääkeaine, joka estää fibroosia kokeellisessa hiirimallissa (Leppäranta – Tikkanen – Besspalov – Koli – Myllärniemi 2013a). Se on paljon tutkittu molekyyli, jolla on tulehdusta vähentäviä sekä virus- ja tuumorivastaisia ominaisuuksia. Eräs sen mielenkiintoinen ominaisuus liittyy siihen, että sillä on kyky käynnistää interferonien tuotanto keuhkokudoksessa. Tiloronilla on kuitenkin todettu olevan myös ei-toivottuja vaikutuksia, kuten näköhäiriöiden ilmaantuminen, mikä on mahdollisesti estänyt sen pitkäaikaisen kliinisen käytön. (Leppäranta ym. 2013b.)

Kolin ryhmän tutkimusten mukaan keuhkofibroosia sairastavilla on keuhkokudoksessaan yhtälailla kohonnut gremlinipitoisuus kuin mesotelioomapotilailla. Korkea gremlinipitoisuus saa aikaan BMP-signaaloinnin heikentymisen ja TGF- β -signaaloinnin vahvistumisen keuhkokudoksessa. Näiden tutkimustulosten perusteella tutkimusryhmä teki hypoteesin, jonka mukaan heikentyneen BMP-signaaloinnin palauttamisella voitaisiin estää fibroosin kehittyminen tai se voisi tarjota potentiaalisen hoitomuodon keuhkofibroosiin. (Leppäranta ym. 2013b.)

Tämän hypoteesin paikkansapitävyyttä tutkittaessa tutkimusryhmä testasi erilaisten molekyylien vaikutuksia kasvutekijäaktiivisuuksiin keuhkoepiteelisolumallissa. Tavoitteena

oli löytää lääkeaine, joka lisäisi BMP-signalointia, lisäämättä kuitenkaan TGF- β -signalointia. Lääkeaine-ehdokkaille tehtiin tarkempia tutkimuksia, joissa tarkasteltiin niiden vaikutuksia BMP-kohdegeenien ilmentymiseen. Lupaavimmaksi valikoitui tiloroni, joka käynnisti BMP-signaaloinnin tarkasteltavissa soluissa. Se lisäsi BMP7:n aktiivisuutta ja erään BMP-kohdegeenin ilmentymistä. (Leppäranta ym. 2013b.) Näiden tutkimustulosten innoittamana haluttiin tutkia tiloronin vaikutuksia myös mesotelioomasoluissa.

Mesotelioomaan tehokasta hoitoa etsittäessä tärkeitä kohteita sairauden parantamiselle näyttäisivät tähänastisten tutkimustulosten valossa olevan siis gremlinin määrän vähentäminen tai BMP-aktiivisuuden lisääminen syöpäkudoksessa.

4 Menetelmät

Opinnäytetyön kokeellisessa työssä käytettyjä laboratoriomenetelmiä olivat soluviljely, transfektio, kasvutekijäaktiivisuuskokeet, RNA-eristys, cDNA-synteesi ja kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR. Aluksi myös suunniteltiin, että tuloksista riippuen kokeellinen työ voisi lisäksi käsittää solujen laskemista proliferaation (eli solujen lisääntymisen) analysoimiseksi, migraatiokokeita, joissa tutkitaan solujen liikkuvuutta sekä syöpäsolujen invasiivisen kasvun tarkastelua 3D-kollageenissa (Koli 2015b). Viimeksi mainitut menetelmät jäivät kuitenkin rajallisen ajankäytön ja saatujen tulosten vuoksi toteuttamatta ja opinnäytetyö keskittyy ensiksi lueteltuihin.

Kaupallisia mesotelioomasoluja stimuloitiin tiloronilla, jonka jälkeen mitattiin TGF- β - ja BMP-signalointireittien aktiivisuutta tai tarkasteltiin tiloronin vaikutusta kohdegeenien ilmentymiseen. Erityisesti jo mainitut BMP-kasvutekijät, gremlini ja epiteeli-mesenkyymitransitioon liittyvien geenien ilmentyminen ja proteiinitasot olivat opinnäytetyössä mielenkiinnonkohteina. (Koli 2015a.)

4.1 Soluviljely

Soluviljely tarkoittaa solujen kasvattamista kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa kiinteillä, esimerkiksi muovisilla, kasvatusalustoilla, joita voivat olla muun muassa petrimaljat, soluviljelypullot tai kuoppalevyt (Solunetti. 2006). Primaari soluviljelmä tarkoittaa sitä viljelyn vaihetta, jossa solut ovat eristetty, mutta niitä ei ole vielä jaettu edelleen. Kun primaaria soluviljelmää jaetaan uusille kasvatusalustoille joitain kertoja, kutsutaan sitä

sen jälkeen solulinjaksi. Ensimmäisen jaon jälkeen solulinja on pasaasia yksi, seuraavassa jaossa pasaasia kaksi ja niin edelleen. (Freshney 2005: 175, 199.) Pasaasia merkitään usein pienellä p-kirjaimella, jonka perässä lukee pasaasin numero. Kasvatusalustaan kiinnittyneitä soluja kasvatetaan ravintoliuoksessa eli mediumissa ja niitä säilytetään hiilidioksidikaapissa. Mediumiin lisätään usein seerumia ja muita solun kasvua, jakautumista ja kiinnittymistä edesauttavia aineita.

Soluviljely on hyvin herkkää ja aseptista työtä ja kontaminaatoriskin olemassaolo on aina huomioitava. Tästä syystä soluviljelyä tulisi toteuttaa vain steriilissä ympäristössä ja hyvän aseptisen käytännön mukaisia toimintatapoja systemaattisesti noudattaen.

4.1.1 Steriili ympäristö

Tilan, jossa soluviljelyä tehdään, tulisi olla rauhallinen, muista laboratoriotiloista erillään, eikä sinne tulisi kohdistua läpikulkuliikennettä. Soluviljely edellyttää steriiliä ympäristöä, jonka luomiseksi laminaari-ilmavirtauskaappi, lyhennettynä laminaarikaappi, on yleisesti käytössä oleva ratkaisu. Laminaarikaapin toiminta perustuu ilmavirtaan, joka kiertää kaapin sisällä luoden suojaavan ilmapatsaan kaapin ulkopuolella olevan työskentelijän ja kaapin sisällä vallitsevan steriilin ympäristön välille. Osa kiertävästä ilmasta suodatetaan HEPA-suodattimen läpi laminaarikaapin yläosassa, josta se laskeutuu jatkuvana vaakana ilmavirtana kohti työskentelytasoa. Korvausilma otetaan huoneilmasta työskentelyaukon kautta ja kuljetetaan työskentelytason alta kaapin yläosassa sijaitsevaan HEPA-suodattimeen. Kaapin ilmavirta on altis häiriöille ja siksi laminaari-ilmavirtauskaapit tulisi sijoitella laboratoriotilaan niin, etteivät ne ole ovien tai ikkunoiden välittömässä läheisyydessä. On tärkeää, ettei laminaarikaappiin kohdistu voimakasta ulkopuolista ilmavirtaa. (Freshney 2005: 74, 78–79.)

Soluviljelytilat tulee siivota huolellisesti ja on huolehdittava siitä, että pölyä ei pääse kertymään lattioille ja muille huoneen pinnoille. Tilassa ei tulisi säilyttää muuta, kuin soluviljelyssä käytettäviä välineitä. Värjäykset, näytteiden käsittely ja eristykset (kuten RNA:n ja DNA:n eristys) tulisi tehdä muualla kuin soluviljelyyn tarkoitettussa laminaarikaapissa. Optimaalisessa tilanteessa soluviljelylle on varattu vain sille tarkoitettu tila sekä laminaarikaappi, jota ei käytetä muiden laboratoriotöiden tekemiseen. (Freshney 2005: 74.)

Usein on kuitenkin niin, että käyttäjiä ja menetelmiä on laboratorioissa paljon, jolloin väistämätäkkin samaa tilaa ja samaa laminaari-ilmavirtauskaappia hyödyntävät moni työntekijä ja käytössä on useampia menetelmiä. Tästä syystä työtä tekevän yksilön on tärkeää kiinnittää huomiota omiin työskentelytapoihin ja noudattaa systemaattisesti hyvän aseptisen käytännön mukaisia toimintatapoja.

4.1.2 Aseptinen käytäntö

Laminaarikaapilla työskenneltäessä työskentelytaso tulee puhdistaa aina ennen soluviljelytöiden aloittamista 70-prosenttisella etanolilla. Sama käsittely tehdään myös kaikille kaappiin vietäville työvälineille. Steriilisti työskenneltäessä tulee käyttää pitkähihaista laboratoriotakkia sekä puhtaita suojakäsineitä. Pitkät hiukset sidotaan kiinni. Työtä tehdessä puhumista tulisi välttää. Laminaarikaapin häiriöille alttiin ilmavirran takia työtä tulee tehdä rauhallisesti ja ylimääräisiä tai nopeita liikkeitä välttää. (Freshney 2005: 74–75.)

Olennaista on suunnitella ja valmistella kaikki mahdollinen etukäteen, toimia nopeasti mutta keskittyneesti käytännön työtä tehdessä ja olla tietoinen steriileistä ja ei-steriileistä pinnoista ja tavaroista laminaari-ilmavirtauskaapissa. Tarvittavat materiaalit on hyvä kerätä valmiiksi laminaarikaapin välittömään läheisyyteen ja kaappiin tulisi ottaa vain juuri sillä hetkellä käytettävät tarvikkeet. Kaikki, mitä kaappiin viedään, puhdistetaan 70-prosenttisella etanolilla. Tavarat järjestellään työskentelytasolle niin, että työn tekijällä on niihin sopiva ulottuvuus. Järjestyksen tulee olla sellainen, että työskentelijän ei tarvitse kurottautua muiden tavaroiden yli yhtä ottaessaan. Keskelle tasoa tulee jäädä riittävästi työskentelytilaa. Jos tavaraa on kaapissa liikaa ja ne ovat työskentelijän ulottumattomissa, kontaminaation riski kasvaa kurkottelun ja laminaarikaapin ilmavirran häiriintymisen takia. Työtasolle mahdollisesti tulevat roiskeet puhdistetaan välittömästi 70-prosenttisellä etanolilla. Kaappi tyhjennetään työn valmistuttua ja työtaso puhdistetaan jälleen 70-prosenttisellä etanolilla. (Freshney 2005: 74–75.)

Solujen suspensointiin sekä reagenssien (kuten trypsiinin ja ravintoliuoksen eli solumediumin) käsittelyyn käytetään muovisia tai lasisia steriilejä pipettejä. Pipetit ovat usein pitkiä ja tämän takia riittävän avara ja selkeä työskentelytila laminaarikaapissa on välttämättömyys. Ahtaassa kaapissa pitkä steriili pipetti osuu helposti ei-steriiliin pintaan, jolloin kontaminaation riski kasvaa. Työskentelijän katseen tulee seurata pipetin kärkeä jatkuvasti. Jos käytössä on lasisia pipettejä, niiden yläosaan tulee laittaa puuvillaista vanua

ennen sterilisointia. Puuvillavanu vähentää pumpetista mahdollisesti tulevan kontaminaation riskiä. Yksittäispakattujen steriilien muovisten pipettien tulee olla filtterillisiä. Elektroninen pipetin täyttäjä muovisia pipettejä käytettäessä helpottaa työskentelyä mahdollistaen solususpension liikutteleminen pipetissä vaivattomasti ylös-alas. (Freshney 2005: 77–78.)

Ennen pipetointia käsiteltävien reagenssipullojen, kuten solumediumin, korkit avataan niin, että ne ovat yhdellä kädellä nostettavissa pois tieltä juuri ennen pipetointia. Pipetti viedään pulloon huolellisesti tarkkaillen sitä, ettei se osu pullon reunoihin. Ainoastaan pipetin kärjen tulisi koskettaa pullossa olevaa nestepintaa. Korkit suljetaan heti käytön jälkeen. Myös kasvatusmaljojen, -kuoppalevyjen ja -pullojen kanssa noudatetaan samaa toimintatapaa eli viljelmiä pyritään pitämään mahdollisimman vähän aikaa auki tai ilman kantta laminaarikaapissa.

4.1.3 Ravintoliuos eli medium

Ravintoliuos eli medium on eri komponenteista koottu seos, joka tarjoaa viljelyalustaan kiinnittyneille soluille otolliset kasvu- ja lisääntymisolosuhteet. Esimerkkejä kaupallisista mediuumeista ovat muun muassa RPMI 1640, MEM ja DMEM. Mediumin optimaalinen pH on 7,4. Solut kuitenkin käyttävät mediumia ravintonaan ja vähitellen kuluttavat siinä olevia ravintoaineita. Tällöin mediumin pH laskee. pH:n muutoksen havaitsemiseksi mediumissa on usein pH-indikaattori, esimerkiksi Phenol Red. Tämän indikaattorin vaikutuksesta medium on aluksi voimakkaan punaista, jonka jälkeen se muuttuu oranssiksi ja siitä vähitellen keltaiseksi solujen kuluttaessa siinä olevia ravinteita. (Freshney 2005: 115–116.)

Mediumin värin muutos eli pH:n aleneminen saattaa olla indikaationa sille, että viljelmän ravintoliuos vaihdetaan tuoreeseen. Muita syitä viljelmän mediumin vaihdolle ovat solujen määrän ja tiheyden kasvu sekä solujen morfologian muuttuminen. Hyvien käytäntöjen mukaista olisi, että soluja jaettaisiin uusille kasvatusalustoille säännöllisin väliajoin tai viimeistään silloin, kun solut kasvavat tiiviisti ja mediumin pH on selvästi alentunut. (Freshney 2005: 205.)

Mediumiin on usein lisätty monia aineita solujen kasvuedellytysten parantamiseksi. Kasvatusliuokseen voidaan lisätä kasvutekijöitä sisältävää seerumia ja monesti myös antibiootteja. On kuitenkin tehtävän kokeen luonteesta ja päämääristä riippuvaista, käytetäänkö näitä aineita.

Seerumi sisältää jo mainittujen kasvutekijöiden lisäksi solujen kiinnittymistä eli adheesiota edistäviä tekijöitä, mineraaleja, lipidejä, hormoneja ja proteiineja. Yleisesti käytössä olevia seerumeita ovat muun muassa FBS (fetal bovine serum), CS (calf serum) ja Human serum eli ihmisen seerumi. Ihmisen seerumia käytettäessä on kuitenkin varmistuttava siitä, ettei siinä ole HI- tai hepatiitti B-viruksia. Adheesiotekijöiden ohella myös jotkut hormonit, kuten FBS-seerumissa oleva kortisoni, edistävät solujen kiinnittymistä kasvatusalustaan. Kortisonilla on oikeissa olosuhteissa myös solujen jakautumista edistävä vaikutus, mutta jos solujen tiheys on liian suuri, voi kortisonilla ilmetä jopa sytostaattisia ominaisuuksia ja se voi aiheuttaa solujen erilaistumista. Proteiinit puolestaan lisäävät seerumin viskositeettia ja jotkin proteiinit, kuten fibronectiini, voivat myös osaltaan edesauttaa solujen adheesiota. (Freshney 2005: 123–125.)

Seerumin käytöllä on kuitenkin myös haittansa. Suurin osa seerumin ainesosista tiedetään, mutta se voi sisältää myös aineita, joita ei tunneta. Näillä aineilla voi olla epäedullisia vaikutuksia solujen kasvuun. Seerumin koostumus ja erien välinen laatu vaihtelee. Lisäksi seerumi saattaa huonontua kauan paikallaan seisoessaan. Kun seerumierä laboratoriossa vaihtuu, tulisi uudelle erälle tehdä testausta ennen sen varsinaista käyttöä. Tämän lisäksi seerumi on altis kontaminaatiolle, erityisesti viruksille. Niinpä sitä käsiteltäessä on noudatettava erityistä huolellisuutta. (Freshney 2005: 129, 132–134.)

Muun muassa näistä edellä kuvatuista seerumin haitoista johtuen, joskus hyvä valinta on viljellä soluja seerumi-vapaassa solumediumissa. On kuitenkin otettava se seikka huomioon, että solujen kasvu todennäköisesti hidastuu tässä tilanteessa.

Antibioottien käyttö soluviljelyssä jakaa mielipiteitä. Alun perin antibiootteja käytettiin kontaminaatioiden vähentämiseksi, mutta laminaari-ilmavirtauskaapin luomien steriilien työskentelyolosuhteiden myötä niiden käytön tarpeellisuus on vähentynyt. Antibioottien käyttö mediumissa edesauttaa niille resistenttien mikro-organismien kehitystä ja ne voivat peittää joitain vallitsevia kontaminanteja kuten mykoplasmainfektiön. Lisäksi antibioottien käytön voidaan katsoa kannustavan huonon aseptisen käytännön toteuttamiseen. (Freshney 2005: 123.)

4.1.4 Kontaminaation riski

Aseptiikka tarkoittaa mikrobeja välttäviä menettelytapoja (Duodecim. Terveyskirjasto. Lääketieteen sanasto. s.v. aseptiikka), joiden tarkka noudattaminen on edellytys soluviljelyn onnistumiselle. Jos näistä menettelytavoista eli aseptisesta käytännöstä luistetaan, on korkea riski siihen, että soluviljelmät kontaminoituvat. Kontaminaatio tarkoittaa sitä, että jokin ei-toivottu mikro-organismi tartuttaa soluviljelmän. Esimerkkejä näistä yleisesti tunnetuista mikro-organismeista ovat bakteerit kuten mykoplasma sekä hiivat ja sienet (erityisesti niiden itiöt). (Freshney 2005: 311.)

Hyvän aseptisen käytännön mukaista on, että soluviljelmiä tarkastellaan aina silmämääräisesti ja mikroskoopilla niitä käsiteltäessä. Lisäksi reagenssien on oltava steriilejä ja ihanteellisessa tilanteessa solumedium sekä muut reagenssit ovat ainoastaan yhden työskentelijän käytössä ja niitä käytetään vain yhdelle solulinjalle. Steriiliä työskentelytapaa noudatetaan kaikissa tilanteissa. Jos kontaminaatio kuitenkin havaitaan ja se ei ole päässyt leviämään muihin viljelmiin, kontaminoituneet viljelmät hävitetään. Myös medium ja muut käytössä olleet reagenssit, kuten trypsiini, hävitetään. (Freshney 2005: 307, 310–311.)

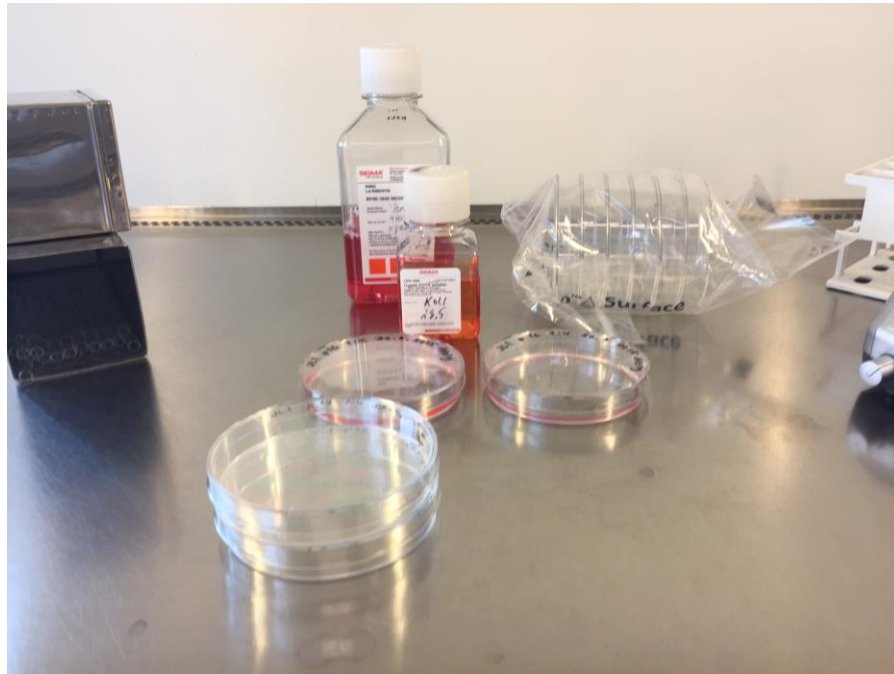
Kuten todettu, kontaminaation riskiin voi merkittävästi vaikuttaa oikeaoppisilla työskentelytavoilla. Tästä huolimatta myös kokenut ja tarkka työskentelijä voi kohdata soluviljelmän kontaminoitumisen. Siihen voi olla useita syitä. Tekniikan puutteiden lisäksi kontaminaatio voi aiheutua ympäristöstä, laminaarikaapin toiminnan puutteista tai sen virheellisestä käytöstä, inkubaattorin kosteudesta, reagenssien kylmäsäilytyksestä, reagenssien ja muiden materiaalien sterilisoinnin puutteista sekä soluviljelmän kuljetuksen aiheuttamista ongelmista. (Freshney 2005: 307, 310–311.)

Soluviljelytilassa tapahtuva läpikulkuliikenne ja muut häiriötekijät voivat aiheuttaa työskentelijän keskittymisen herpaantumisen, joka saattaa johtaa puutteellisiin aseptisiin työskentelytapoihin ja kontaminaation syntymiseen. Muita ympäristöstä aiheutuvia mahdollisia kontaminaation aikaansaajia on riittämätön siisteydestä huolehtiminen ja tavaroiden vaillinaisen puhdistaminen. Jos laminaarikaapissa on liikaa tavaraa ja sen äärellä työskentelee huolimattomasti esimerkiksi viemällä käsiä jatkuvasti laminaarikaapin ulkopuolelle, voi ilmavirta häiriintyä ja aiheuttaa kontaminaation soluviljelmään. Myös laminaarikaapin virheellinen tai puutteellinen toiminta voi johtaa samaan lopputulokseen. (Freshney 2005: 307, 310–311.)

Reagenssien säilytys jääkaapeissa ja kylmähuoneissa voi olla myös yksi syy kontaminaation aiheutumiselle. Kylmälaitteen/huoneen ovea avattaessa laitteen/huoneen seinille kondensoituu vettä ja seinät kostuvat. Tämä luo otollisen alustan sienien kasvamiselle. Kostean ilman mukana näistä sienistä voi kulkeutua itiöitä reagenssipulloihin, joista ne huolimattoman etanoli-puhdistuksen jälkeen voivat joutua laminaarikaappiin ja siellä kontaminoida soluviljelmän. Toisinaan myös reagenssien ja muiden tarvikkeiden sterilisoinnissa voi olla puutteita, jolloin ne voivat itsessään aiheuttaa kontaminaatioita. Kontaminaatio voi aiheutua myös soluviljelmien kuljettamisessa, jolloin viljelmät pääsevät kallistumaan, jonka seurauksena solumediumia voi esimerkiksi joutua petrimaljan kanteen tai kannen ja pohjan väliin. (Freshney 2005: 311.)

Viljelymaljoilla ja kuoppalevyillä kasvatetuilla viljelmillä onkin muun muassa edellä kuvasta syystä korkeampi riski kontaminoitua kuin viljelypulloilla. Varsinkin petrimaljoilla on suurempi pinta-ala alttiina kontaminaatiolle kannen ollessa auki, verrattuna viljelypulloon. Lisäksi riski siitä, että työskentelijä koskee kannettoman maljan reunaa, on suurempi. Kun työskentelytasolla levännyt kansi laitetaan lopulta maljan päälle, on mahdollista, että sen mukana kulkeutuu kontaminantti soluviljelmään. (Freshney 2005: 83.)

Näiden petrimaljan käyttöön liittyvien edellä kuvattujen riskien välttämiseksi on syytä kiinnittää huomiota siihen, ettei työskentele avoimen maljan tai kannen yllä, laittaa kannen takaisin paikoilleen heti kun mahdollista ja välttää maljojen kallistelua ja heiluttamista maljoja liikuteltaessa. Varsinkin siinä tilanteessa, kun niitä siirretään laminaarikaapista hiilidioksidikaappiin ja päinvastoin. Jos kanteen joutuu solumediumia esimerkiksi kapillaari-ilmion aikaansaamana, on hyvä vaihtaa kansi puhtaaseen. (Freshney 2005: 83.)



Kuvio 1. Kaksi soluviljelmää, petrimaljoja, trypsiiniä ja RPMI 1640-mediumia.

4.2 Kasvutekijäaktiivisuuksien mittaaminen

Kasvutekijäaktiivisuuskokeissa tutkittiin tiloronin vaikutusta TGF- β - ja BMP-kasvutekijäreittien aktiivisuuteen mesotelioomasoluissa. Näissä kokeissa promootorin ja reportterigeenin (lusiferaasigeenin) sisältävillä plasmideilla (puhutaan myös promootorikonstrukteista) transfektoidaan tutkittavia soluja. Transfektiossa plasmidi viedään transfektioagenssin avulla kohdesoluihin. Kun transfektoituja soluja stimuloidaan kasvutekijällä ja tiloronilla, soluun transfektoidun plasmin promootori aktivoituu, alkaa reportterigeenin luenta, lähetti-RNA:n muodostus ja lusiferaasi-nimisen proteiinin tuotanto. Tämän reitin aktiivisuuden taso riippuu kuitenkin siitä, vaikuttaako tiloronikäsittely siihen sen aktiivisuutta lisäävästi vai vähentävästi. Syntyvän lusiferaasin määrää mitataan entsymaattisin menetelmin ja sen määrän perustella saadaan tietoa tutkittavan kasvutekijäreitin aktiivisuudesta.

4.2.1 Transfektio

Transfektioilla tarkoitetaan nukleiinihappojen, kuten DNA:n ja RNA:n, viemistä aitotumalisen solun sisään muilla keinoilla kuin viruksen avulla. Transfektiota voidaan toteuttaa useilla eri menetelmillä, joita ovat esimerkiksi erilaisiin kemikaaleihin perustuvat mene-

telmät, liposomien ja muiden rasvarakenteiden avulla tapahtuva transfektio sekä fysikaaliset menetelmät kuten elektroporaatio. Transfektio on tehokas menetelmä tutkittaessa geenien toimintaa ja proteiinien ilmentymistä kohdesolussa. Tämä teknologia mahdollistaa muun muassa nisäkkäiden promoottori- ja tehostajasekvenssien sekä lähetti-RNA:n muodostumisen tutkimisen. Transfektio tekee mahdolliseksi negatiivisesti varautuneiden molekyylien, kuten DNA:n ja RNA:n, viemisen soluihin, joilla on myös negatiivisesti varautunut solukalvo. Esimerkiksi jotkin kemikaalit saavat soluun vietävän molekyylin varauksen positiiviseksi. Näin molekyyli, usein DNA, on helpompi kuljettaa solun sisään negatiivisesti varautuneen solukalvon läpi. (Transfection. 2013.)

Transfektioimenetelmän ja -olosuhteiden valinta täytyy tehdä aina erikseen tutkittavasta solulinjasta riippuen. Asioita, joita tulee transfektiota suunnitellessa ottaa huomioon, ovat muun muassa transfektioagenssin valinta, kokeen aikataulun määrittäminen, transfektoitavan molekyylin piirteiden määrittäminen sekä tehtävän protokollan kokonaisuuden kirjoittaminen. Esimerkiksi käytettävä transfektioagenssi on valittava viljeltyjen solujen tyyppin mukaan, sillä kaikki transfektioagenssit eivät toimi yhtä tehokkaasti kaikissa solulinjoissa. (Transfection. 2013.)

Transfektion mahdollisimman tehokkaan onnistumisen maksimoimiseksi on määriteltävä optimaalinen transfektion jälkeinen viljelyaika, joka vaihtelee usein 24–72 tunnin välillä. Optimaaliseen viljelyaikaan vaikuttavat tutkittava solutyypin, tutkimuksen tavoitteet ja transfektoidun reportterigeenin tyypilliset ilmentymispiirteet. (Transfection. 2013.)

Plasmidi-DNA:n lisäksi soluihin voidaan transfektoida myös muita makromolekyyliä. Näitä ovat esimerkiksi RNA ja jopa kokonaiset proteiinit. On kuitenkin otettava huomioon, että plasmidi-DNA:lle sopivat transfektio-olosuhteet eivät välttämättä toimi yhtä tehokkaasti muiden makromolekyylien transfektioinnissa. Yleisesti ottaen transfektion onnistumiseksi nukleiinihappojen tulee olla proteiinivapaita eikä niissä ei saa olla muista nukleiinihapoista eikä kemikaaleista aiheutuvaa kontaminaatiota. Proteiinien tulisi olla puhtaita ja sellaisessa liuoksessa, joka ei aiheuta solukuolemaa. (Transfection. 2013.)

Transfektion tehokkuuteen vaikuttaa moni tekijä ja ne on otettava huomioon transfektiota toteutettaessa. Soluja tulisi kasvattaa kyseiselle solulinjalle optimaalisissa olosuhteissa eikä kontaminoituneita soluja tulisi koskaan transfektoida. Solujen kasvatusmediumin tulee olla tuoretta ja sisältää solujen kasvuun tarvittava seerumi ja mahdollisesti antibiootit sekä glutamiini. Solujen kasvattamisessa tulee ottaa erityisesti huomioon se, että niitä on optimaalinen määrä kasvatusalustan pinta-alaan nähden. Solujen tulee siis olla niin

sanotusti hyvässä kasvun vaiheessa. Usein solujen tulisi peittää 40–80% kasvatusalustan (esimerkiksi kasvatusmalja tai -pullo) pinta-alasta. Liian vähäinen solujen määrä kasvatusalustalla aiheuttaa viljelmän heikon kasvun solujen keskinäisen kontaktin puuttuessa. Jos solut eivät ole sopivassa kasvun vaiheessa, niiden kyky vastaanottaa vierasta DNA:ta heikkenee. (Transfection. 2013.)

Solujen piirteet muuttuvat ajan kuluessa. Tästä syystä myöhäinen pasaasi ei välttämättä transfektoidu samalla tavalla samoissa transfektio-olosuhteissa kuin aikaisempi pasaasi. Näin ollen tarkasteltu promootoriaktiivisuus saattaa jäädä matalaksi. Myös DNA:n laatu on oleellisessa osassa transfektion onnistumisessa. Kuten aiemmin todettu, transfektoitavan DNA:n tulisi olla vapaata proteiineista, RNA:sta, kemikaaleista ja mahdollisista muista kontaminanteista. (Transfection. 2013.)

4.2.2 Lusiferaasimittaus

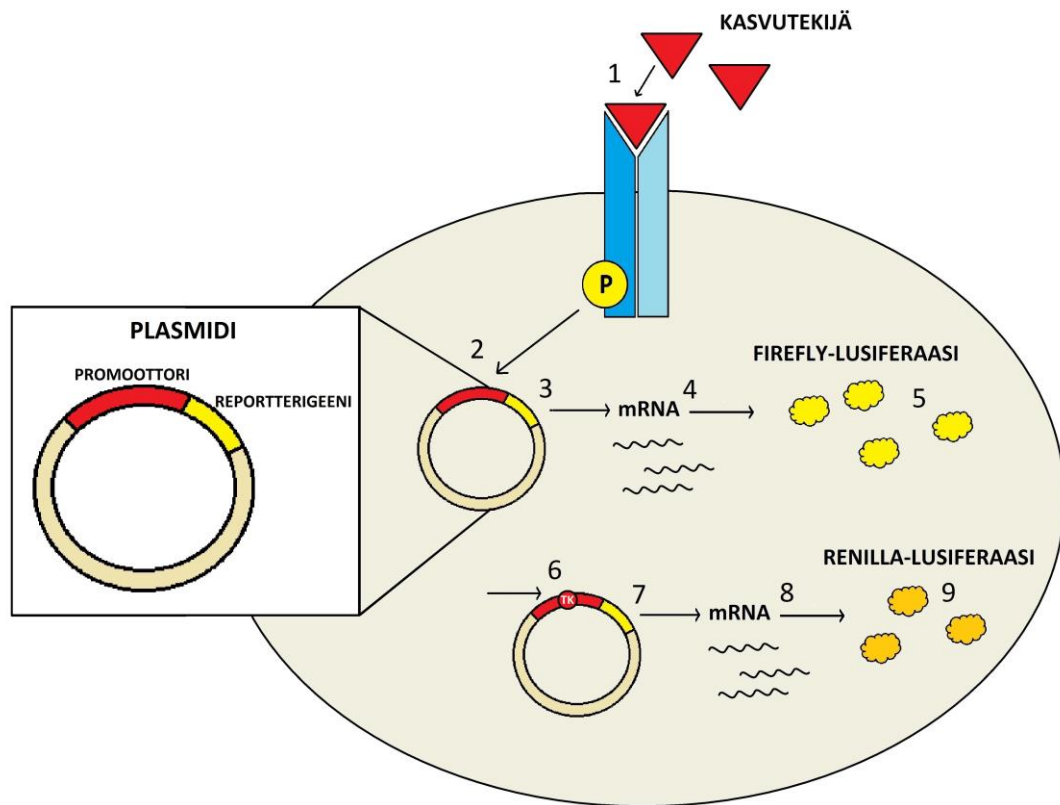
Transfektion onnistumisen määrittelemiseksi täytyy valita menetelmä, jolla sitä tarkastellaan. Esimerkiksi plasmideja, jotka sisältävät promootorin ja kokeellisen reportterigeenin (esimerkiksi lusiferaasigeenin), voidaan käyttää helposti transfektion tehokkuuden ja onnistumisen määrittelyyn. Ideaalinen kokeellinen reportterigeeni on kohdesolulle spesifi ja sen ilmentyminen onnistuu plasmidi-DNA:n kautta. (Transfection. 2013.) Kun transfektoitu promootori aktivoituu ja kokeellisen reportterigeenin luenta käynnistyy, alkaa solussa lusiferaasin tuotanto ja sen määrää voidaan mitata lusiferaasimittauksella.

Lusiferaasimittauksia hyväksikäyttäen voidaan tarkastella muun muassa solun sisäisiä signaalireittejä, lähetti-RNA:n tuotantoa, uusien proteiinien laskostumista sekä reseptoriaktiivisuuksia. Menetelmässä tarkastellaan ja mitataan samanaikaisesti kahden itsenäisen reportterientsyymien eli lusiferaasin aktiivisuutta saman systeemin sisällä. Tällaisen menetelmän etu on siinä, että kokeellinen täsmällisyys paranee. Menetelmän sisällä voidaan nimittäin ajatella olevan kokeellinen- ja niin sanottu kontrollireportterientsyymi, joista kontrollireportterientsyymi toimii systeemin sisäisenä kontrollina ja tarjoaa vertailukohdan kokeellisen reportterientsyymien aktiivisuuden tarkastelulle. Tästä esimerkkinä ovat Renilla- ja firefly-reportterientsyymit, joista Renilla toimii kokeen sisäisenä kontrollina ja firefly kokeellisenä reportterinä. Renilla ja firefly ovat lusiferaaseja. (Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011.)

Lusiferaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät bioluminesenssireaktioon. Evolutiivisten lähtökohtien eroista johtuen firefly- ja Renilla-lusiferaaseilla on erilaiset entsyymirakenteet ja substraattivaatimukset. Näiden eroavaisuuksien ansiosta on mahdollista erottaa kullekin entsyymille ominainen bioluminesenssireaktio. Tämä ero entsyymien välillä mahdollistaa näin ollen Renilla-lusiferaasin luminesenssireaktion aktivoimisen samanaikaisesti, kun firefly-lusiferaasireaktio sammuu. (Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011.)

Näytteestä ensin mitattava firefly-lusiferaasi on monomeerinen proteiini, joka ei vaadi translaation jälkeistä käsittelyä toimiakseen aktiivisena entsyyminä. Sama ominaisuus on myös Renilla-lusiferaasilla, ja tämä mahdollistaa molempien proteiinien kohdalla sen, että ne voivat toimia geneettisinä proteiineina heti translaation jälkeen. (Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011.)

Kun kokeellisen reportterientsyymien eli firefly-lusiferaasin aktiivisuus suhteutetaan sisäisen kontrollin eli Renilla-lusiferaasin aktiivisuuteen, saadaan solujen määrässä ja transfektion tehokkuudessa tapahtuvat kokeiden väliset vaihtelut minimoitua. (Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011.) TK-Renilla eli tymidiinikinaasi-Renilla on soluihin transfektoitava promoottori, joka on tasaisesti aktiivinen riippumatta siitä, miten soluja käsitellään. Tymidiinikinaasi on entsyymi, joka on aktiivinen DNA:ta syntetisoivissa soluissa (Tymidiinikinaasi. 2007). Soluihin transfektoitava TK-Renilla-promoottorialue on osa tymidiinikinaasin promoottoria. Transfektoitavaa promoottorialuetta aktivoivat tietyt transkriptiotekijät solussa ja sen aktivointi saa aikaan lusiferaasigeenin luennan ja Renilla-lusiferaasin tuotannon.



Kuvio 2. Kaaviokuva soluun transfektoitujen promoottorikonstruktioiden (plasmidien) toiminnasta. Kasvutekijä sitoutuu sille spesifiseen reseptoriin solun pinnalla¹, jolloin soluun transfektoitujen plasmidien promoottori aktivoituu² ja alkaa reporterigeenin luenta³, lähetti-RNA:n muodostus⁴ ja firefly-lusiferaasientsyymin tuotanto⁵. Samanaikaisesti TK-Renilla-promoottori aktivoituu⁶, jolloin alkaa lusiferaasigeenin luenta⁷, lähetti-RNA:n muodostus⁸ ja Renilla-lusiferaasin tuotanto⁹.

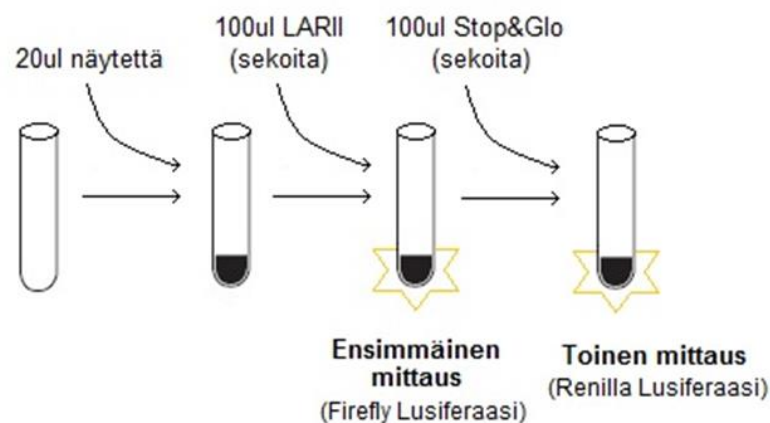
Lusiferaasien tuottama bioluminesenssi on yksi kemiluminesenssin ilmenemismuoto, joka voidaan havaita monissa luonnon organismeissa. Bioluminesenssi voidaan jakaa eri luokkiin kemiallisten ominaisuuksiensa perusteella, mutta niiden kaikkien taustalla voidaan havaita samanlaisia kemiallisia reaktioita. Kaikki bioluminesenssin luokat nimittäin perustuvat lusiferaasi-entsyymin ja luminogeneettisen substraatin vuorovaikutukseen, jonka seurauksena syntyy valoa. (Bioluminescent Reporter Gene Assays. 2015.)

Kemiluminesenssi on fluoresenssin rinnalla toinen menetelmä, jossa tarkastellaan molekyyliorbitaalien viritystilojen purkautumisen seurauksena syntyvien fotonien määrää. Nämä kaksi poikkeavat toisistaan siinä, miten orbitaalien viritystilat ovat syntyneet. Kemiluminesenssissa viritystilat ovat eksotermisten kemiallisten reaktioiden aikaansaamia, kun taas fluoresenssissa viritystilat syntyvät valon absorptio aiheuttamana. Kemiluminesenssin etuna on se, että toisin kuin fluoresenssissa, kemiluminesenssi ei tarvitse fo-

toneita viritystilojen syntymiseen. Tämä on hyvä asia siitä syystä, että fluoresenssin vaatimat fotonit eivät luminesenssia mitattaessa aiheuta luontaista säteilytaustaa kun mitataan fotonien määrää näytteestä. (Bioluminescent Reporter Gene Assays. 2015.)

Kemiluminesenssin mittaamiseksi tutkitut solut hajotetaan, jolloin firefly- ja Renilla-lusiferaasit vapautuvat soluista. Solujen hajottamisessa näytekuopista imetään kasvatusmedium pois, solut pestään PBS-liuoksella ja kuoppiin lisätään PLB-hajotuspuskuria. Kuoppalevyä ravistellaan soluravistelijalla. Hajoamisen onnistumista tarkastellaan mikroskoopilla. Jos solujen hajoaminen ei tapahdu tarpeeksi tehokkaasti, näytekuoppia voi sekoittaa lisäksi pipetillä.

Kun solut ovat hajonneet, jokaisesta näytekuopasta siirretään näytettä mittausputkiin. Yhteen mittausputkeen lisätään pelkkää PLB-hajotuspuskuria taustasäteilyn mittaamiseksi. Käytetyssä kaupallisessa protokollassa (Dual Luciferase Assay system, Promega Corporation) firefly- ja Renilla-lusiferaasien aktiivisuudet mitataan peräkkäin samasta näytteestä. Solujen hajottamisen jälkeen näytteeseen lisätään Luciferase Assay Reagent II:ta (LARII) firefly-lusiferaasi-entsyymin aktiivisuuden mittaamiseksi. Reagensin lisääminen näytteeseen saa aikaan luminesenssi-signaalin, jota mitataan luminometrillä. Firefly-luminesenssin mittaamisen jälkeen LARII-puskurin aikaansaama reaktio loppuu ja näytteeseen lisätään Stop&Glo-puskuria, jonka vaikutuksesta voidaan mitata Renilla-lusiferaasi-reaktio. (Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011.)



Kuvio 3. Lusiferaasimittaus.

4.3 Geeniekspressioiden mittaaminen

Geeniekspressiokokeissa tarkasteltiin tiloronin vaikutusta tiettyjen kohdegeenien ilmentymiseen tutkituissa mesotelioomasoluissa. Protokollassa tiloroni-stimuloiduista soluista eristettiin RNA:ta, RNA:sta syntetisoitiin cDNA:ta ja lopulta tehtiin kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR-reaktio.

4.3.1 RNA-eristys

RNA-eristys silikapylväsmenetelmällä toteutetaan kaupallisen pakkauksen (RNeasy MiniKit, Qiagen) tarjoamilla reagensseilla silikakalvon eli membraanin sisältävässä kolumnissa. Käsitellyt solut hajotetaan ja näyte homogenisoidaan. Tämän jälkeen soluista vapautunut RNA sidotaan silikapylvään membraanille, näytettä pestään pesupuskureilla ja lopulta se eluoidaan eli uutetaan näyteputken pohjalle. RNA on yksijuosteisen rakenteensa vuoksi hyvin herkkää hajoamaan, jonka takia se on tärkeää siirtää jälle mahdollisimman pian eristämisen jälkeen.

Ensimmäisessä vaiheessa soluilta imetään kasvatusmedium pois ja lisätään RLT-puskuria niiden hajottamiseksi. Soluja voidaan hajottaa tämän lisäksi myös mekaanisesti raaputtamalla niitä irti näytekuopan pohjasta solulastalla. Tämän jälkeen näyte homogenisoidaan ruiskulla ja neulalla, ja siirretään steriiliin näyteputkeen. Näytteeseen lisätään 70-prosenttista etanolia ja sekoitetaan huolellisesti. Hyvin sekoitettu näyte siirretään kolumniin kahdessa osassa ja molemmissa väleissä kolumnia sentrifugoidaan. Kolumnin läpi tullut neste heitetään pois. Näiden vaiheiden aikana RNA sitoutuu kolumnin membraanille. (Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology. 2012.)

Kun RNA on sidottu membraanille, seuraavat RNA-näytteen pesuvaiheet. Kolumniin lisätään ensin RW1-puskuria ja sen jälkeen RPE-puskuria. Molempien lisäyksien jälkeen seuraa lyhyt sentrifugointi. RPE-puskurin lisäys toistetaan, mutta nopean sentrifugoinnin sijaan kolumnia sentrifugoidaan pidempään korkeammilla kierroksilla. (Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology. 2012.)

RNA-eristyksen viimeinen vaihe on RNA:n eluointi eli uuttaminen. Sentrifugoidut kolumnit siirretään puhtaisiin näyteputkiin ja sentrifugointi toistetaan. Tämän jälkeen kolumnit siirretään uudestaan puhtaisiin näyteputkiin ja kolumneihin lisätään nukleaasi-vapaata vettä. On tärkeää huomata, että vesi pipetoidaan suoraan silikakalvolle. Kolumneja

sentrifugoidaan, jonka jälkeen RNA on uutettu näyteputken pohjalle ja kolumnin voi heittää pois. (Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology. 2012.)

4.3.2 RNA:n puhtaus

Koska kvantitatiivista PCR-menetelmää käytettäessä tutkitun RNA-näytteen puhtauden ja laadun tulisi olla korkeatasoista luotettavan analyysin onnistumiseksi, on tärkeää määrittää RNA:n puhtausaste ja konsentraatio ennen qPCR-ajoa. RNA ja DNA absorboivat valoa aallonpituudella 260nm, jonka perusteella voidaan laskea RNA/DNA-näytteen konsentraatio.

RNA-näytteen puhtaudesta kertovat OD-suhdeluvut OD260/280 ja OD260/230. Matala 260/230-arvo saattaa olla merkki kontaminantista, joka absorboi aallonpituutta <230nm ja matala 260/280-arvo saattaa puolestaan kertoa kontaminantista, joka absorboi aallonpituutta <280nm. Epäpuhtauksia RNA-näytteissä saattavat aiheuttaa muun muassa eristyksessä käytetyt näytteeseen jääneet kemikaalit, fenoli tai proteiinit. RNA:lle suhdelukua 2.0 pidetään puhtauden raja-arvona. (Assessment of Nucleic Acid Purity.)

260/230-suhdeluvun normaalista poikkeavat arvot voivat aiheutua monesta syystä. Matalat 260/230-arvot voivat johtua esimerkiksi eristyksessä näytteeseen jääneestä fenolista tai guanidiinista sekä saostamiseen käytetystä glykokeenista. Korkeat 260/230-arvot puolestaan voivat olla merkki blanko-arvon mittaamisesta likaisella mittausalustalla tai arvon mittaamisesta sopimattomalla liuoksella; esimerkkinä, jos näytteet ovat laimennettu steriliin veteen, tulee blanko-arvo myös mitata steriilillä vedellä eikä esimerkiksi TE-puskurilla. (Assessment of Nucleic Acid Purity.)

260/280-suhdeluvun poikkeamat viittaavat usein miten näytteen kontaminoitumiseen proteiinilla tai reagenssilla. Myös ongelmat mittaamisessa voivat aiheuttaa vaihtelua 260/280-arvoihin. Lisäksi näytteen hyvin matala konsentraatio (<10ng/μl) voi aiheuttaa alhaisen 260/280-arvon. Korkeat 260/280-arvot eivät viittaa ongelmaan näytteen puhtaudessa. (Assessment of Nucleic Acid Purity.)

4.3.3 cDNA-synteesi

Laadukkaaksi varmistettu RNA muokataan qPCR-reaktiota varten cDNA-molekyyliksi. cDNA eli komplementaarinen DNA tarkoittaa DNA-molekyyliä, joka on syntetisoitu lähetti-RNA:sta käänteistranskriptaasi- eli käänteiskopioijaentsyymin avulla (Perinnöllisyyslääketiede 2006. Sanasto. s.v. cDNA). Tämä voidaan toteuttaa kaupallisen pakauksen tarjoamilla reagensseilla. RNA-templaattit laimennetaan ja niihin lisätään kaupallinen reaktioseos sekä entsyymi. Reaktioseoksessa on cDNA-synteesiin tarvittavat komponentit, joista käänteistranskriptaasi syntetisoi cDNA-molekyylin esimerkiksi PCR-laitteessa.

4.3.4 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

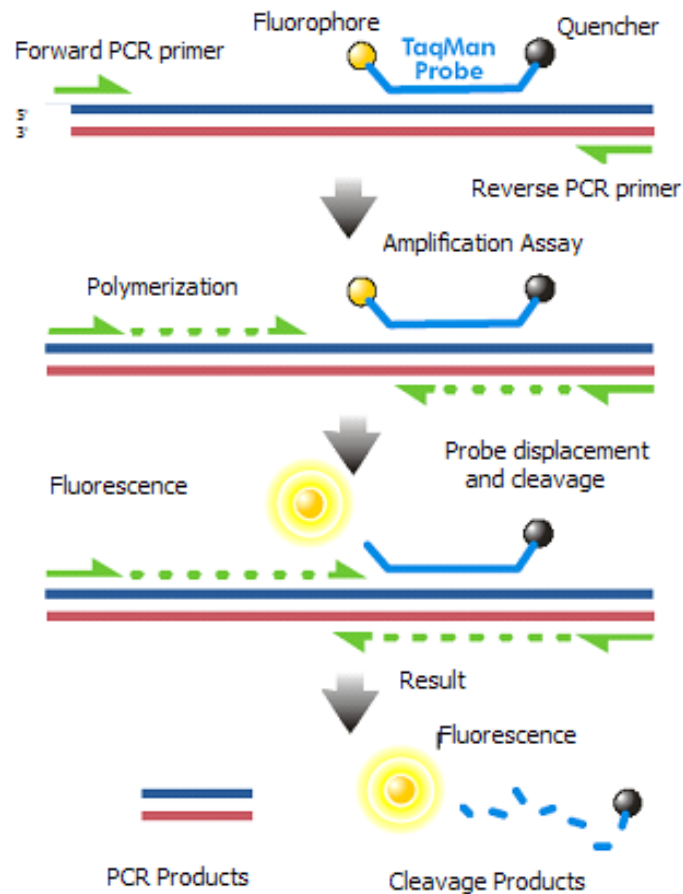
Yleisesti ottaen PCR eli polymeraasiketjureaktio on menetelmä, jossa tutkittavaa DNA-sekvenssiä monistetaan moninkertaiseksi tehtäviä analyysejä varten. PCR-reaktio tapahtuu PCR-laitteessa, johon ohjelmoitu PCR-ohjelma muuttaa laitteen lämpötilaa määrättyin aikaväleihin. Lämpötilanvaihtelut vaikuttavat tunnetulla tavalla DNA-molekyyliä koossapitäviin sidoksiin. Lämpötilaa nostamalla saadaan DNA:n kaksijuosteinen rakenne aukeamaan, jolloin nyt yksijuosteisen sekvenssin rinnalle voi paritua sille komplementaariset, sekvenssiltään tunnetut, alukkeet. Tämän jälkeen lämpöstabiili DNA-polymeraasientsyymi rakentaa reaktioseoksessa vapaana olevista nukleotideista uutta komplementaarista vastinjuostetta templaattiin pariutuneiden alukkeiden rajaamalle alueelle. Lopputuloksena jokaisella monistuskierroksella uusien identtisten DNA-kopioiden määrä kaksinkertaistuu eli niiden määrä kasvaa PCR-reaktion edetessä eksponentiaalisesti. (Huoponen – Orpana 2006: 271–272.)

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR eli qPCR on perinteisen PCR-tekniikan sovellutus, jossa mitataan reaktiossa syntyvien DNA-kopioiden määrää reaaliaikaisesti. Kvantitatiivisten PCR-menetelmien etu on niiden korkeassa herkkyydessä ja menetelmän vaatimassa suhteellisen pienessä näytemäärässä. Tavoitteena on määrittää kohdemolekyylien määrä alkuperäisessä näytteessä reaktiossa syntyvän PCR-tuotteen määrän perusteella. Kvantitatiivinen PCR-reaktio etenee eksponentiaalisesti, mikä tarkoittaa sitä, että syntyvän PCR-tuotteen määrä kaksinkertaistuu jokaisella PCR-syklillä. Tämän toteutuminen täydellisesti (reaktion tehokkuuden ollessa 100 %) on kuitenkin mahdollista vain ideaaliolosuhteissa. Käytännössä tehokkuus on tätä matalampaa tasoa ja voi vaihdella

huomattavasti reaktion edetessä. Reaktion tehokkuuteen vaikuttaa muun muassa näytteen laatu ja siinä olevat epäpuhtaudet voivat näin ollen madaltaa tehokkuuden tasoa. (Sugden 2005: 327–329.)

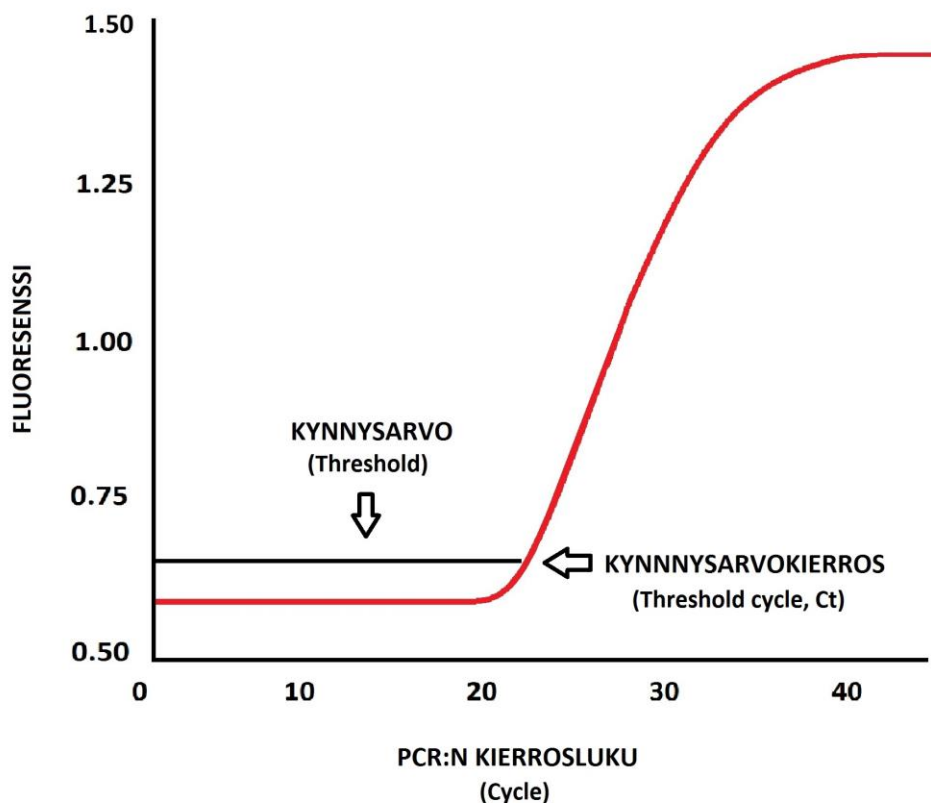
Kvantitatiivisen PCR:n eksponentiaalisesta luonteesta johtuen rinnakkaisten näytteiden väliset pienet poikkeavuudet reaktion tehokkuudessa kertaantuvat reaktion edetessä ja voivat lopulta johtaa huomattaviin eroihin syntyvien PCR-tuotteiden määrässä. Esimerkiksi jos kahden näytteen reaktitehokkuuksissa on yli 5 % ero alkutilanteessa, voi 26. PCR-kierroksen jälkeen toisessa näytteessä olla jopa kaksi kertaa enemmän PCR-tuotetta. (Sugden 2005: 327–329.) Tätä eroa voidaan kontrolloida esimerkiksi TBP-kontrolligeenillä (TATA binding protein). TBP on endogeeninen kontrolligeeni, jonka ilmentyminen soluissa on vakaata riippumatta soluille tehdystä käsittelystä. Kun TBP-ekspressio suhteutetaan muiden tutkittavien geenien ilmentymiseen, saadaan luotettavia qPCR-tuloksia.

Opinnäytetyössä käytetty kvantitatiivinen PCR-menetelmä perustui TaqMan-teknologiaan. TaqMan-teknologia pohjautuu TaqMan-koettimeen, jonka 5'- ja 3'-päässä on fluoresenssileima. Templaatin ollessa yksijuosteisessa muodossa, koetin kiinnittyy sille komplementaariseen kohtaan DNA-sekvenssissä. PCR:n pidennysvaiheessa polymeerasientsyymi rakentaa reaktioseoksessa olevista vapaista nukleotideista uutta vastinjuostetta templaatille. Polymeeraasin kohdatessa templaattiin sitoutuneen TaqMan-koetimen, koetin katkeaa ja irtaana templaatista. Samalla fluoresenssileimat vapautuvat ja voidaan havaita fluoresoivaa säteilyä. Tämä havaitaan qPCR-laitteiston detektorilla. (Dötsch – Schoof – Rascher 2005: 305–313.)



Kuvio 4. TaqMan-tekniikan periaate. (Wikimedia Commons. 2015.)

Kvantitatiivisessa PCR-reaktiossa PCR-tuotetta syntyy eksponentiaalisesti, mutta tuotteen muodostuminen hidastuu reaktion edetessä, kun reaktioon tarvittavat materiaalit alkavat huetua. Saavutetaan niin sanottu PCR:n *plateau*-vaihe. Tästä syystä luotettavan analyysin tekeminen on mahdollista ainoastaan PCR:n varhaisen eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. (Sugden 2005: 327–329.) Jotta mittaukset varmasti tapahtuvat tässä reaktion vaiheessa, on määritettävä kynnysarvo (engl. threshold), jonka kohdalla mittaus tapahtuu. PCR:n kierroslukua, jolla tämä kynnysarvo saavutetaan, kutsutaan kynnysarvokierrokseksi eli Ct-arvoksi (engl. threshold cycle). (Dötsch ym. 2005: 305–313.) Tulokset analysoidaan näiden Ct-arvojen perusteella.



Kuvio 5. Geeniekspression määrittäminen TaqMan-PCR:n periaatteella.

5 Työn toteutus

Kokeellisessa työssä tutkittiin kolmea kaupallista mesotelioomasolulinjaa: 211H-, JL1- sekä H2052-soluja. Kokeiden alussa 211H-mesotelioomasolut olivat pasaasia p36, JL1-solut p13 ja H2052-solut p31. Kaikki tutkitut solulinjat ovat eristetty mesotelioomapotilaiden syöpäsolunäytteistä, esimerkiksi pleuranesteestä. JL1- ja H2052-solut ovat peräisin hoitamattomasta pleuran epiteliaalisesta mesotelioomasta. Niistä molemmat tuottavat greliiniä ja niiden kasvun on havaittu olevan invasiivista 3D-kollageenissa. 211H-solut ovat puolestaan lähtöisin bifaasisesta eli sekamuotoisesta keuhkopussin mesotelioomasta. Kaikki edellä kuvatut solulinjat ovat adherentteja eli kiinnittyvät kasvatusalustansa niitä viljeltäessä. (DSMZ; ATCCa; ATCCb.) Soluja kasvatettiin RPMI 1640-kasvatusmediumissa, johon oli lisätty 10 % FBS (fetal bovine serum), penisilliini- ja streptomysiinantibiootit sekä glutamiini. Niitä säilytettiin hiilidioksidikaapissa 37 °C-asteen lämpötilassa, 5 % CO₂-pitoisuuden vallitessa.



Kuvio 6. Mikroskooppikuvat 211H-, JL1- ja H2052-solulinjoista.

Mesotelioomasoluja viljeltiin muovisilla kasvatusmaljoilla (halkaisija 10cm) ja niitä jaettiin solulinjasta riippuen joitain kertoja viikossa jatkomaljoille suhteessa 1:6 (211H), 1:4 (H2052) tai 1:3 (JL1). Jakamiskertojen välillä solujen kasvatusmedium vaihdettiin. Maljoja tarkasteltiin joka aamu mikroskoopilla. Tarkastelussa katsottiin sitä, etteivät maljat pääse kasvamaan liian täyteen, solut ovat jakautuneet alustalleen tasaisesti ja etteivät ne ole kontaminoituneet hiivalla. Soluviljelyssä pyrittiin noudattamaan tarkasti hyvän aseptisen käytännön mukaisia toimintatapoja.

Solujen jakaminen jatkomaljoille tai kuoppalevyille koetta varten aloitettiin irrottamalla ne kasvatusalustastaan trypsiinillä. Kasvutekijäaktiivisuuskokeita varten soluja jaettiin 96-kuoppalevyille 5000 (211H), 8000 (H2052) tai 10 000 (JL1) solua/kuoppa. Geeniekspressiokokeita varten soluja jaettiin 6-kuoppalevyille; JL1-soluja 300 000/kuoppa ja H2052-soluja 200 000/kuoppa. Samalla jaettavasta maljasta tehtiin kaksi jatkomaljaa.

Kasvutekijäaktiivisuuskokeissa soluja inkuboitin yön yli kuoppalevyllä, jonka jälkeen seuraavana päivänä seurasi solujen transfekointi. Soluihin transfektoitiin (CAGA)₁₂- ja Bre₂-promoottorikonstruktit, joiden avulla tutkittiin TGF- β - ja BMP-kasvutekijäreittien aktiivisuuksia. TGF- β -kasvutekijä aktivoi (CAGA)₁₂-promoottoria ja BMP-kasvutekijä Bre₂-promoottoria. Lisäksi transfektoitiin kontrollina toimiva TK-Renilla-promoottorikonstrukti.

Transfektioon käytettiin Promegan FuGENE HD –transfektioagenssia. Se on suunniteltu DNA:n transfektoimiseen moniin solulinjoihin tehokkaasti ja turvallisesti. Reagenssi on yhdistelmä lipidejä ja muita komponentteja 80-prosenttisessa etanolissa. Reagenssi ei sisällä humaani- eikä eläinperäisiä materiaaleja. (FuGENE HD Transfection Reagent. 2013.) Transfektiota seuraavana päivänä soluja stimuloitiin TGF- β - ja BMP-kasvutekijöillä sekä tiloronin eri pitoisuuksilla (5 μ M, 10 μ M ja 20 μ M). Stimuloinnissa käytettiin seerumivapaata RPMI 1640-solumediumia.

Lusiferaasientsyymi-mittaukset toteutettiin Promega Corporationin Dual Luciferase Assay system –menetelmällä. Käytetty mittauslaite oli DRC-1-luminometri (MGM Instruments Digene Diagnostics Inc.). Solujen hajottamiseksi niitä ravisteltiin Thermomixer-soluravistelijalla (22 °C, 350RPM) 20–30 minuuttia riippuen hajoamisen tehokkuudesta.

Geeniekspressiokokeita tehtiin JL1- ja H2052-soluille. Nämä solulinjat valittiin siitä syystä, että niiden tiedettiin tuottavan gremliniä. Soluja viljeltiin kuoppalevyllä yön yli. Seuraavana päivänä soluja stimuloitiin tiloronilla (5 µM, 10 µM ja 20 µM). Stimulaatiota pidettiin kokeesta riippuen 24 tai 48 tuntia. Stimulaatiossa käytettiin seerumivapaata RPMI 1640-solumediumia. RNA:n eristämiseen käytettiin Qiagenin RNeasy Mini Kit –pakkausta ja RNA:n konsentraation sekä puhtausasteen määrittämiseen Shimadzun BioSpec Nano –laitetta.

L37									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	21.5.2015								
2									
3	JL1 and H2052 Cells								
4	Elution volume 50ul								
5									
6	Sample Name	Date & Time	Analyte	Nucleic Acid Conc(ng/µL)	OD260/280	OD260/230			
7	JL1 Ctrl	15.5.2021 15:08	RNA	113.01	2,08	1,97			
8	JL1 Tilorone 5uM	15.5.2021 15:09	RNA	89.81	2,13	0,45			
9	JL1 Tilorone 10uM	15.5.2021 15:09	RNA	122.70	2,10	2,11			
10	JL1 Tilorone 20uM	15.5.2021 15:10	RNA	85.16	2,03	2,11			
11	H2052 Ctrl	15.5.2021 15:11	RNA	178.56	2,08	2,18			
12	H2052 Tilorone 5uM	15.5.2021 15:12	RNA	134.07	2,12	1,12			
13	H2052 Tilorone 10uM	15.5.2021 15:13	RNA	125.82	2,10	1,64			
14	H2052 Tilorone 20uM	15.5.2021 15:14	RNA	78.90	2,11	0,18			
15									
16									
17									

Kuvio 7. Esimerkkikuva Shimadzun BioSpec Nano –laitteella mitatuista RNA-tuloksista Excel-tilukossa.

Eristetylle RNA:lle tehtiin cDNA-synteesi Bio-Rad:n iScript cDNA Synthesis Kit –pakkauskella, jossa käänteiskopioijana on RNase H+ (iScript cDNA Synthesis Kit. Pakkausohje). iScript cDNA Synthesis Kit –pakkaus sisältää valmiin reagenssiseoksen sekä entsyymien. RNA-templaattit laimennettiin nukleaasi-vapaaseen veteen Excel-ohjelmassa lasketun taulukon mukaan. Laimennettuun templaattiin lisättiin reagenssiseos ja entsyymi. cDNA:n syntetisointiin käytettiin Bio-Rad:n MJ Research PTC-200 thermal cycler –PCR-laitetta.

L37									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
17									
18	cDNA								
19									
20	Sample Name	Nucleic Acid Conc(ng/ μ L)	RNA ng	RNA template x μ L	Nuclease-free water x μ L				
21	JL1 Ctrl	113.01	1000	8,8	6,2				
22	JL1 Tilorone 5uM	89.81	1000	11,1	3,9				
23	JL1 Tilorone 10uM	122.70	1000	8,1	6,9				
24	JL1 Tilorone 20uM	85.16	1000	11,7	3,3				
25	H2052 Ctrl	178.56	1000	5,6	9,4				
26	H2052 Tilorone 5uM	134.07	1000	7,5	7,5				
27	H2052 Tilorone 10uM	125.82	1000	7,9	7,1				
28	H2052 Tilorone 20uM	78.90	1000	12,7	2,3				
29				total 15 μ L/reaction					
30									
31									

Kuvio 8. Esimerkkikuva RNA-templaattien laimennustaulukosta cDNA-synteesiä varten.

Kvantitatiivisissa PCR-kokeissa käytettiin valmista iQ supermix –reaktioseosta (Bio-Rad), joka sisältää kaikki kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR:n toteuttamiseen tarvittavat materiaalit, kuten iTaq DNA-polymeraasin, nukleotidit, $MgCl_2$:n, tehostajajaksot ja reaktiota stabiloivat tekijät (iQ Supermix. Pakkausohje). Käytetty qPCR-laitteisto oli CFX 96 Real time PCR detection system (Bio-Rad). Käytössä oli TaqMan Gene Expression Assay (Lifetechnologies), joka tarjosi TaqMan-koettimet sekä alukkeet Grem1, BMP2, -4, -7 sekä TBP.

6 Tulokset

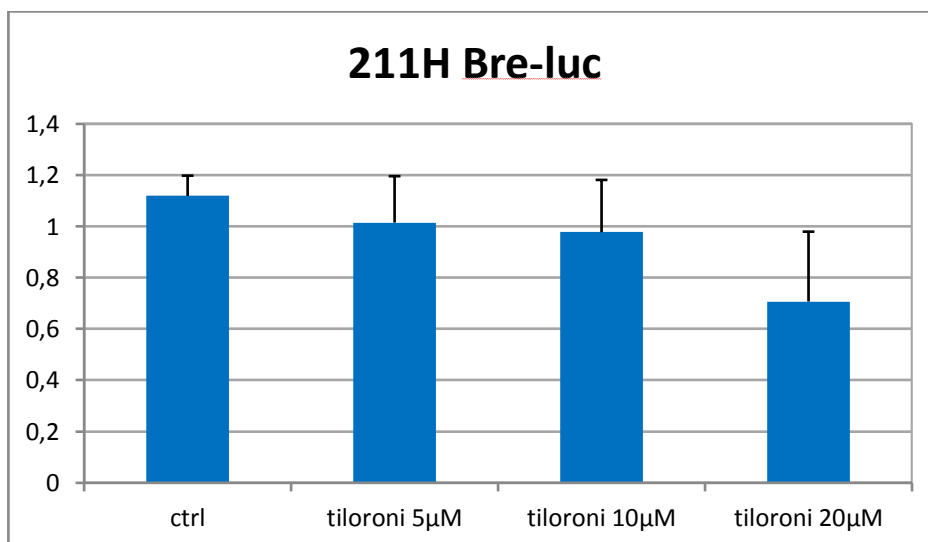
Opinnäytetyön kaikki tulokset analysoitiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla, jossa numeeristen tulosten perusteella piirrettiin pylväsdiagrammit havainnollistamaan tutkitun parametrin muutosta suhteessa tiloroniin konsentraatiiriippuvaisesti.

6.1 Kasvutekijäaktiivisuuskokeet

Kasvutekijäaktiivisuuskokeissa BMP- ja TGF- β -kasvutekijäreittien aktiivisuutta soluissa tarkasteltiin Bre_2 - ja $(CAGA)_{12}$ -promoottorikonstruktioiden avulla. BMP aktivoi Bre_2 -promoottoria ja TGF- β $(CAGA)_{12}$ -promoottoria. Molemmissa tapauksissa käynnistyy lusiferaasigeenin luenta, lähetti-RNA:n muodostus ja lusiferaasiproteiinin tuotanto. Lusiferaarin määrää mitattiin entsymaattisesti luminometrillä.

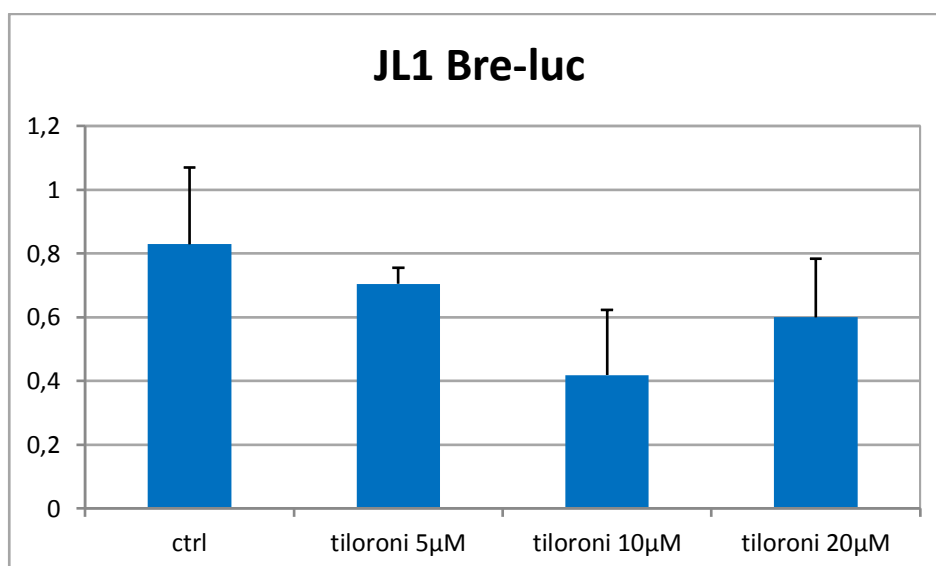
Luminometrillä mitattiin jokaisesta näytteestä sekä taustaputkesta (jossa oli vain PLB-puskuria) firefly- ja Renilla-lusiferaasit, joista Renilla-lusiferaasi toimi kokeen sisäisenä kontrollina ja firefly-lusiferaasi kokeellisena reportterina ((CAGA)₁₂ tai Bre₂). Tulokset saatiin laitteesta RLU-arvoina (Relative Light Unit). Nämä arvot syötettiin manuaalisesti Excel-ohjelmaan, jossa jokaisen näytteen tuloksesta vähennettiin mitattu tausta-arvo. Tämän jälkeen firefly-lusiferaasi-tulokset jaettiin kontrollina toimivan Renilla-lusiferaasin tuloksilla ja ensimmäinen kontrolli asetettiin vertailukohdaksi muille näytteille määrittämällä sen arvoksi yksi, johon kaikki muut tulokset suhteutettiin. Rinnakkaisista tuloksista laskettiin tämän jälkeen keskiarvo, jonka perusteella piirrettiin pylväsdiagrammi havainnollistamaan tuloksia. Lisäksi määritettiin rinnakkaisten tulosten välinen keskihajonta (stdev eli standard deviation).

211H-soluille tehtiin kaksi identtistä kasvutekijäaktiivisuuskoea, joissa molemmissa stimulaatioaika oli 24 tuntia. (CAGA)₁₂-aktiivisuus oli molemmissa kokeissa niin matalaa tasoa, ettei sitä voitu pitää luotettavana, eikä näin ollen TGF- β -tuloksia otettu huomioon. Tästä syystä ainoastaan 211H-solulinjan Bre₂-tuloksia on tarkasteltu analysoinnissa. Molemmissa kokeissa nähdään saman trendin toistuvan, eli BMP-aktiivisuus alenee tiloronikäsittelyllä (kuvio 9).



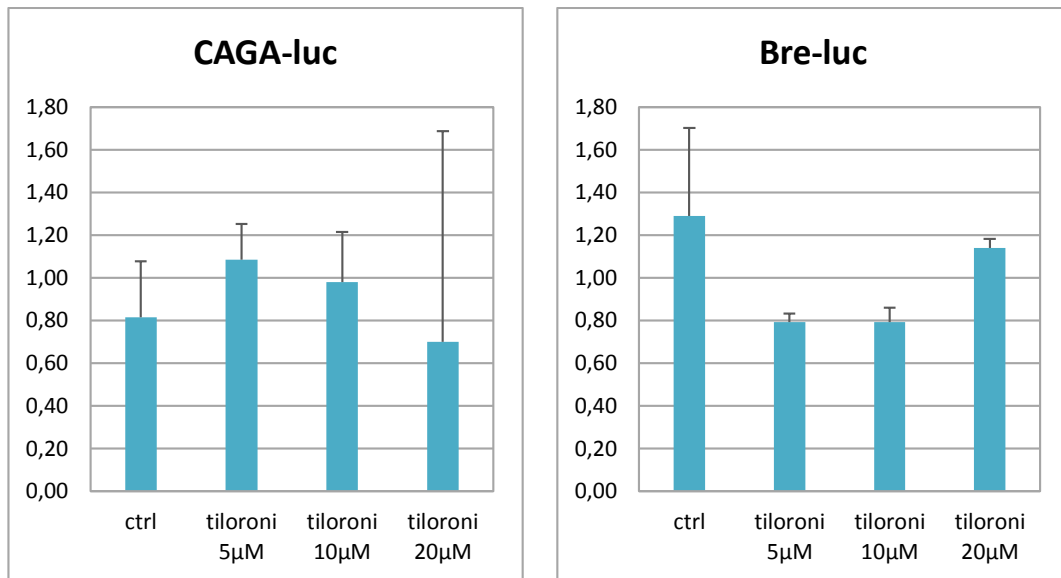
Kuvio 9. 211H-solulinja, kahden kokeen yhdistetyt tulokset. Keskihajonta kuvaa näiden kahden kokeen välistä vaihtelua.

JL1-soluille tehtiin yksi kasvutekijäaktiivisuuskoe, jossa tutkittujen solujen stimulaatio-aika oli 24 tuntia. Tässä solulinjassa nähdään saman tuloksen toistuvan, kuin aikaisemmin tutkitussa 211H-solulinjassa; tiloroni näyttää vähentävän BMP-aktiivisuutta (kuvio 10).

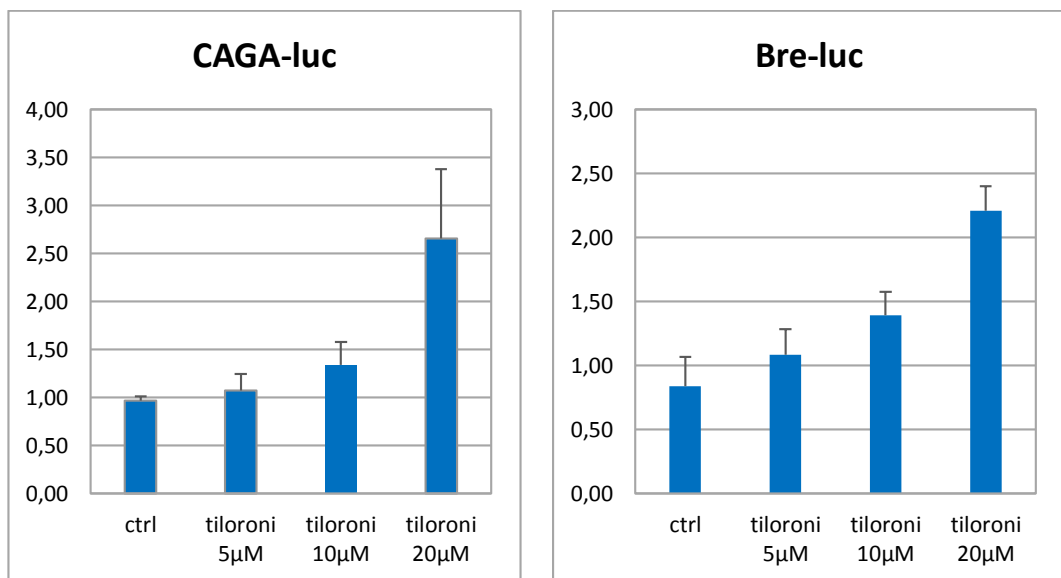


Kuvio 10. JL1-solulinja, yhden kokeen tulokset. Keskihajonta kuvaa kokeen sisäistä, rinnakkais-ten näytteiden välistä, vaihtelua.

H2052-soluille tehtiin kaksi kasvutekijäaktiivisuuskoe, joissa stimulaatioajat olivat 24 tuntia ja 48 tuntia. Näissä kokeissa tarkasteltiin sekä (CAGA)₁₂- että Bre₂-promoottorin aktiivisuutta. 24 tunnin stimulaatiolla ei nähdä merkittäviä muutoksia promoottoriaktiivisuuksissa (kuvio 11). 48 tunnin stimulaatiolla puolestaan sekä TGF- β että BMP-aktiivisuus lisääntyy tiloronin vaikutuksesta (kuvio 12).



Kuvio 11. H2052-solulinja, 24 tunnin stimulaatio. Keskihajonta kuvaa kokeen sisäistä, rinnakkais-ten näytteiden välistä, vaihtelua.



Kuvio 12. H2052-solulinja, 48 tunnin stimulaatio. Keskihajonta kuvaa kokeen sisäistä, rinnakkais-ten näytteiden välistä, vaihtelua.

6.2 Geeniekspressiokokeet

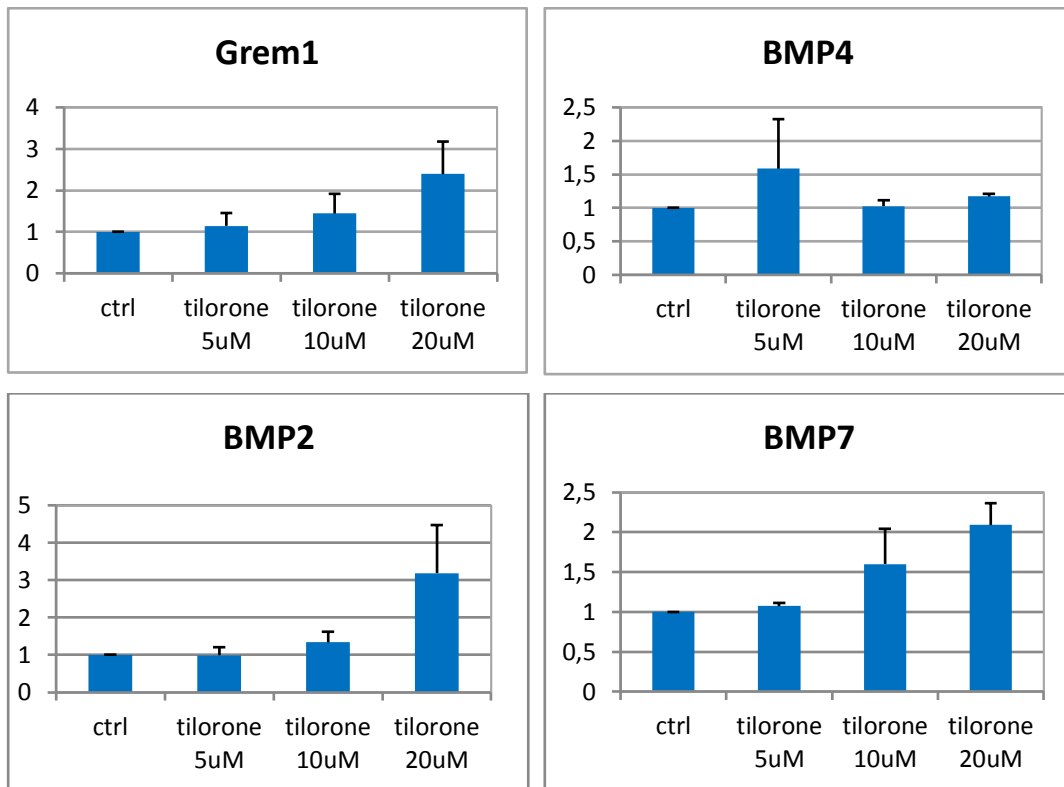
Geeniekspressiokokeissa tutkittiin tiloronin vaikutusta Grem1-, BMP2-, BMP4- ja BM7-geenien ilmentymiseen mesoteliomasoluissa. qPCR-mittauksissa tulokseksi saatiin Ct-arvoja, jotka siirrettiin Excel-ohjelmaan niiden analysointia varten. Rinnakkaisia tuloksia vertailtiin keskenään, eivätkä ne saaneet poiketa toisistaan kuin enintään 0,5 yksikön verran tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Luotettavuuden toisena kriteerinä oli,

ettei analysoitavien kierroslukujen tulisi olla suurempia kuin 35. Tulokset laskettiin kyn-
nysarvokierrosten (eli Ct-arvojen) perusteella käyttäen $2\Delta\Delta C_t$ -menetelmää ja ne suhteu-
tettiin kontrollina toimivaan TBP-geeniin.

X35																	
	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
8		JL1 Cells								H2052 Cells							
9																	
10				Sample 1	Sample 2	Average	$2^{1*(1-x)}$						Sample 1	Sample 2	Average	$2^{1*(1-x)}$	
11		TBP	ctrl	26,31	26,76	26,535	1			TBP	ctrl	26,81	26,87	26,84	1		
12			tilorone 5uM	26,29	26,27	26,28	1,193336				tilorone 5uM	26,51	26,33	26,42	1,337928		
13			tilorone 10uM	26,16	25,99	26,075	1,375542				tilorone 10uM	26,72	26,85	26,785	1,038859		
14			tilorone 20uM	25,85	25,63	25,74	1,735077				tilorone 20uM	27,5	27,22	27,36	0,697372		
15							/TBP									/TBP	
16		Grem1	ctrl	33,02	33,51	33,265	1	1		Grem1	ctrl	32,45	31,32	31,885	1	1	
17			tilorone 5uM	33,32	32,94	33,13	0,98093	0,920188			tilorone 5uM	30,59	30,79	30,69	2,289448	1,71119	
18			tilorone 10uM	32,23	33,06	32,645	1,536875	1,117287			tilorone 10uM	30,62	31,1	30,86	2,034959	1,958841	
19			tilorone 20uM	31,13	32,04	31,585	3,20428	1,846765			tilorone 20uM	30,77	30,49	30,63	2,386671	3,42238	
20																	
21		BMP2	ctrl	29,03	29,54	29,285	1	1		BMP2	ctrl	28,23	28,34	28,285	1	1	
22			tilorone 5uM	29,27	29,34	29,305	0,986233	0,82645			tilorone 5uM	28,08	28,01	28,045	1,180993	0,882703	
23			tilorone 10uM	28,91	28,37	28,64	1,563739	1,136817			tilorone 10uM	28,21	28,32	28,265	1,013959	0,976032	
24			tilorone 20uM	27,28	27,33	27,305	3,944931	2,273634			tilorone 20uM	28,19	28,43	28,31	0,982821	1,409321	
25																	
26		BMP4	ctrl	26,71	26,78	26,745	1	1		BMP4	ctrl	26,37	26,77	26,57	1	1	
27			tilorone 5uM	26,52	26,28	26,4	1,270151	1,06437			tilorone 5uM	26,97	27,15	27,06	0,712025	0,532185	
28			tilorone 10uM	26,02	26,31	26,165	1,494849	1,086735			tilorone 10uM	27,64	27,76	27,7	0,456916	0,439825	
29			tilorone 20uM	25,74	25,77	25,755	1,986185	1,144724			tilorone 20uM	28,69	28,32	28,505	0,261521	0,37501	
30																	
31		BMP7	ctrl	34,85	34,36	34,605	1	1		BMP7	ctrl	35,21	35,66	35,435	1	1	
32			tilorone 5uM	34,25	34,17	34,21	1,314943	1,101905			tilorone 5uM	35,09	35,29	35,19	1,185093	0,885768	
33			tilorone 10uM	32,41	34,01	33,21	2,629886	1,911891			tilorone 10uM	35,67	35,43	35,55	0,923382	0,888843	
34			tilorone 20uM	33,1	32,67	32,885	3,294364	1,898684			tilorone 20uM	34,39	35,95	35,17	1,201636	1,723092	
35																	

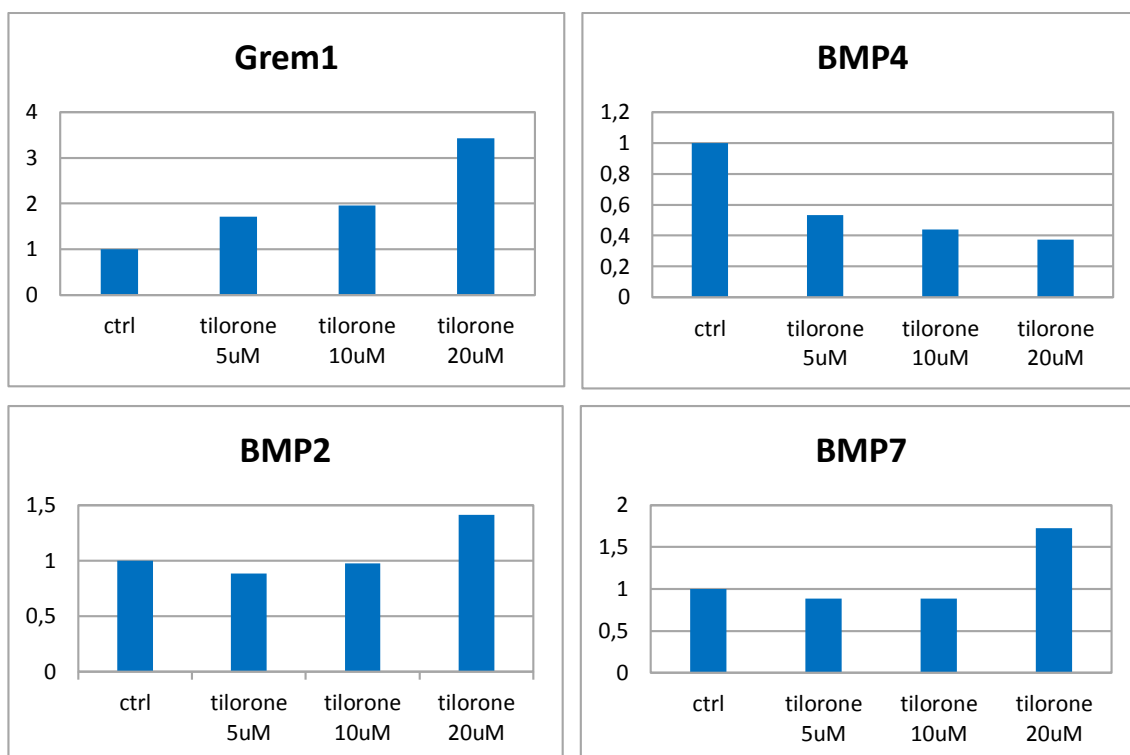
Kuvio 13. Esimerkkikuva $2\Delta\Delta C_t$ -menetelmällä analysoiduista qPCR-tuloksista Excel-taulukossa.

JL1-soluille tehtiin kaksi identtistä koetta, joissa molemmissa solujen stimulaatioaika oli 48 tuntia. Tehdyissä kokeissa havaitaan gremlinin ilmentymisen lisääntyvän tiloronilla konsentraatiiriippuvaisesti. Myös BMP-geenien ilmentymisen nähdään lisääntyvän tiloronekäsittelyllä, erityisesti BMP2:n ja BMP7:n tapauksessa (kuvio 14).



Kuvio 14. Kahden kokeen yhdistetyt qPCR-tulokset JL1-soluille 48 tunnin stimulaatiolla. Keskihajonta kuvaa näiden kahden kokeen välistä vaihtelua.

Tiloronilla 48 tuntia stimuloiduille H2052-soluille tehtiin yksi qPCR-koe. Myös H2052-solulinjan soluissa voidaan nähdä saman trendin toistuvan; gremlinin ilmentyminen lisääntyy tiloronilla lähes konsentraatiiriippuvaisesti. Suurimmalla tiloronikonsentraatiolla nähdään lisäksi pieni BMP2- ja BMP7-induktio (kuvio 15). Tämä koe olisi kuitenkin hyvä toistaa tulosten varmistamiseksi.



Kuvio 15. qPCR-tulokset H2052-soluille 48 tunnin stimulaatiolla.

Tosiasiallisesti JL1- ja H2052-solulinjan soluissa BMP7-tasot olivat kokeita toistettaessa hyvin matalat. BMP4:n tasot olivat puolestaan korkeimmat; sitä mesotelioomasolut näyttivät siis tekevän eniten.

7 Yhteenveto

Opinnäytetyön alussa suunniteltiin, että tutkimuskysymyksiin lähdetään hakemaan vastausta tutkien kasvutekijöiden signaalintireittien aktiivisuutta ja BMP-geenien ilmene- mistä. Tuloksista ja aikaresursseista riippuen suunniteltiin myös hyödynnettävän funk- tio-naalisia kokeita kuten migraatiokokeita, solujen laskemista proliferaation analysoi- miseksi sekä mesoteliooman invasiivisen kasvun tarkastelua 3D-kollageenissa.

Tuloksista ja ajankäytöllisistä syistä kokeellinen työ keskittyi lopulta ensiksi lueteltuihin menetelmiin eli kasvutekijäaktiivisuuskokeisiin sekä geeniekspressiokokeisiin. Näin ol- len raportin alussa kuvatuista tutkimuskysymyksistä oleellisemmaksi muodostui ensim- mäinen; Säätelee-kö tiloroni TGF- β - ja/tai BMP-kasvutekijäreittien aktiivisuutta mesoteli- oomasoluissa? Tähän kysymykseen lähdettiin hakemaan vastausta kasvutekijäaktiivi- suuskokeilla, joita toteutettiin kaikille tutkituille solulinjoille eli 211H-, JL1- sekä H2052-

soluille. Kokeita pyrittiin toistamaan laadukkaiden ja paikkansa pitävien tulosten saamiseksi.

Toinen esitetty tutkimuskysymys – Estääkö tiloroni mesotelioomasolujen kasvua, liikkumista tai invasiivista kasvua? – liittyi vahvasti opinnäytetyön suunniteltuun osaan ja menetelmiin, joita ei rajallisen ajankäytön ja saatujen tulosten takia toteutettu. Kysymykseen voidaan hakea kuitenkin vastausta tehtyjen geeniekspressiokokeiden tuloksista. qPCR-kokeissa havaittiin gremlinin ilmentymisen lisääntyvän tiloronilla konsentraattoriippuvaisesti. Tämän voidaan ajatella tarkoittavan sitä, että tiloroni ei estä mesotelioomasolujen invasiivista kasvua. Johtopäätös on tehty pohjautuen tutkimusryhmän aiempiin havaintoihin, joissa gremliniekspressio on vahvasti linkattu mesoteliooman invaasioon 3D-kollageenissa.

7.1 Tulosten tulkintaa

Kolin tutkimusryhmän aiemmissa keuhkofibroosiin liittyvissä tutkimuksissa havaittiin, että keuhkoepiteelisolujen käsittely tiloronilla palautti BMP-kasvutekijöiden aktiivisuuden ja vähensi TGF- β -kasvutekijän aktiivisuutta. Keuhkofibroosin ja mesoteliooman taustalla olevien samankaltaiseen kasvutekijöiden epänormaaliin ilmentämiseen liittyvien mekanismien takia haluttiin tutkia tiloronin vaikutuksia myös mesotelioomasoluissa. Opinnäytetyössä tehdyissä kokeissa tarkasteltiin edellä mainittujen kasvutekijöiden (BMP ja TGF- β) aktiivisuuksia sekä BMP:n ja gremlinin toimintaa säätelevien geenien ilmenemistä.

Ensimmäisissä kasvutekijäaktiivisuuskokeessa tarkasteltiin sekä (CAGA)₁₂- että Bre₂-promootorin aktiivisuutta 211H- ja JL1-solulinjojen soluissa. Saadut tulokset olivat näissä kokeissa lähes päinvastaiset kuin hypoteesi antoi olettaa. Tutkimusryhmän aiempiin tutkimustuloksiin nojaavan hypoteesin mukaan tiloronin konsentraation kasvaessa (CAGA)₁₂-aktiivisuuden tulisi vähentyä ja Bre₂-aktiivisuuden lisääntyä. Toisin sanoen aiempien tutkimustulosten valossa BMP-signaaloinnin toivottiin voimistuvan tiloronilla niin, ettei TGF- β -signaali kuitenkaan voimistuisi. Opinnäytetyön ensimmäisissä tutkimustuloksissa kuitenkin näytti siltä, että tiloronin lisääminen voimisti TGF- β -signaalia ja vähensi BMP-signaalia.

(CAGA)₁₂-promootorin aktiivisuudet olivat kuitenkin kasvutekijäaktiivisuuskokeita toistettaessa jatkuvasti niin matalia, ettei näitä tuloksia voitu pitää luotettavina. Tästä syystä

ensimmäisissä tuloksissa tarkastellaankin vain Bre_2 -aktiivisuutta, joka laski tiloronin vaikutuksesta 211H- ja JL1-soluissa. Hypoteesin mukaan tiloronin odotettiin lisäävän BMP-aktiivisuutta sen konsentraatiota lisättäessä, mutta tehdyissä kokeissa tulos oli päinvastainen.

H2052-soluissa tarkasteltiin sekä $(CAGA)_{12}$ - että Bre_2 -promootorien aktiivisuuksia. 24 tunnin stimulaatiolla ei nähty merkittäviä muutoksia kasvutekijäreittien aktiivisuuksissa. 48 tunnin stimulaatioajalla molempien promootorien aktiivisuus kuitenkin lisääntyi. Solujen tiloroni-käsittely siis lisäsi TGF- β - ja BMP-kasvutekijäreittien signalointia. Ryhmän aiempiin tutkimustuloksiin nojaavan olettamuksen mukaan odotettiin TGF- β :n signaloinnin vähenevän, joka tässä kokeessa kuitenkin lisääntyi. BMP-signalointi lisääntyi myös, joka puolestaan tukee tehtyä hypoteesia.

qPCR-menetelmällä tehdyissä geeniekspressiokokeissa tutkittiin JL1- ja H2052-solulinjan soluja, sillä näiden solujen tiedettiin tuottavan gremlinia. Gremlinin ilmentymisen toivottiin vähenevän tiloronin vaikutuksesta. Sen ekspressio kuitenkin lisääntyi molemmissa solulinjoissa tiloronilla konsentraatioriippuvaisesti. Molemmat solulinjat näyttivät myös ilmentävän BMP2- ja BMP7-kasvutekijöitä sitä enemmän, mitä korkeampi tiloronin konsentraatio oli kyseessä. Tämä tulos vastaa hypoteesia, jonka mukaan tiloronin toivottiin palauttavan gremlinin vähentämää BMP-ilmentymistä. Tosiasiassa molemmissa solulinjoissa BMP7-tasot olivat kuitenkin hyvin matalat; solut tekivät sitä siis vähän. BMP4:ää solut puolestaan tekivät eniten. Tämä tulos on linjassa tutkimustyhmän aiempien havaintojen kanssa.

7.2 Johtopäätökset ja tulevaisuudennäkymiä

Johtopäätöksenä voidaan sanoa, ettei mesotelioomasoluissa tutkituissa promootoriaktiivisuuksissa ($(CAGA)_{12}$ ja Bre_2) nähty samaa tulosta kuin ryhmän aiemmissa tutkimuksissa, joissa keuhkoepiteelisolujen käsittely tiloronilla lisäsi BMP-aktiivisuutta ja vähensi TGF- β -aktiivisuutta. Geeniekspressiokokeissa BMP-löydökset olivat melko samanlaisia kuin aiemmin (BMP-ekspressioiden lisääntyminen), mutta sen lisäksi myös gremlinin ilmentyminen lisääntyi. Tämän voidaan ajatella tarkoittavan sitä, ettei tiloroni ole tehokas invaasion estäjä mesotelioomasoluissa.

Kaiken kaikkiaan opinnäytetyössä tehdyissä kokeissa ei nähty tiloronilla olevan samanlaisia vaikutuksia mesotelioomasoluissa kuin sillä oli keuhkoepiteelisoluissa ryhmän

aiemmissa tutkimuksissa. Näin ollen opinnäytetyön alussa suunniteltuja funktionaalisia kokeita ei toteutettu. Tulosten valossa voidaan siis todeta, ettei tiloroni näytä toimivan mesotelioomaa hillitsevästi, vaikka sillä on todettu olevan keuhkofibroosia vähentäviä vaikutuksia.

Kokeita olisi voinut jatkaa esimerkiksi tutkimalla tiloronin vaikutusta mesoteliooman invaasioon 3D-kollageenissa, mutta saadut tutkimustulokset eivät antaneet siihen aihetta. Näin ollen herää kysymys, voisiko joku muu lääkeaine hillitä mesotelioomaa ja mahdollisesti vaikuttaa siihen sen invasiivisia piirteitä vähentävästi? Uusia lääkeaine-ehdokkaita voidaan etsiä esimerkiksi kemikaaliseulonnalla ja niiden vaikutuksia mesotelioomasoluissa voidaan tarkastella samanlaisin menetelmin kuin opinnäytetyössä.

7.3 Työn luotettavuus ja eettisyys

Lait, kansainväliset sopimukset, eettiset ohjeet ja tiedeyhteisön hyväksymät toimintatavat ovat hyvän tieteellisen käytännön perusta. Koko tutkimusprosessin, ideasta ja syntyneestä hypoteesista julkaisuun, tulee olla luotettava. Tämä luotettavuus taataan, kun tieteen tekijä noudattaa hyvän tieteellisen käytännön mukaisia toimintatapoja. (Louhiala – Pelkonen 2002.)

Hyvä tieteellinen käytäntö tarkoittaa tutkimuseettisen neuvottelukunnan laatimia ohjeita, joissa on kuvattu tutkimustyössä merkittäviä arvoja ja käytänteitä, joita tulee koko tutkimusprosessissa noudattaa. Tutkimustyön toteuttamisessa sekä tulosten tallentamisessa, esittämisessä ja arvioinnissa tärkeää on tutkimuksen tekijän tarkkuus, huolellisuus ja rehellisyys. Sovellettavien menetelmien tulee olla eettisesti kestäviä ja tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia. Tutkimusmenetelmä ei määrää sitä, mitä tutkimusta tehdään vaan tutkimus määrittelee käytettävän menetelmän. Koko tutkimusprosessi tulee suunnitella, toteuttaa ja raportoida yksityiskohtaisesti ja tulokset tulee esittää avoimesti. Poikkeamat perustellaan ja kirjataan muistiin, eikä mitään tuloksia jätetä raportoimatta. Tutkimuksessa tulee arvostaa ja osoittaa kunnioitusta muista tieteen tekijöistä, julkaisuja ja tuloksia kohtaan ja niihin tulee viitata asiaankuuluvalla tavalla. Tieteen tekijä vastaa itse hyvän tieteellisen käytännön noudattamisesta. Kun tämän mallin mukaan toimitaan, mahdollistuu muiden tieteen tekijöiden julkaisujen ja tulosten hyödyntäminen ja totuudenmukaisen tiedon kehittyminen, kun seuraavissa tutkimuksissa korjataan edellisen virheitä. (Kuula 2011: 34–36; Louhiala – Pelkonen 2002; Niiniluoto 2002.)

Opinnäytetyön eksperimentit toteutettiin huolellisesti ja tarkasti noudattaen asianmukaisia käytäntöjä ja työohjeita. Työssä hyödynnettiin sen luonteeseen sopivia tutkimusmenetelmiä. Kokeita pyrittiin toistamaan tulosten luotettavuuden varmistamiseksi ja satunnaisen variaation minimoimiseksi. Tämän lisäksi kaikissa kokeissa käytettiin rinnakkaismäärittämiä. Kyse ei siis ole vain yhden tuloksen perusteella tehdyistä johtopäätöksistä.

Tulosten kuvaaminen on pyritty toteuttamaan tieteellisen tutkimuksen eettisiä lähtökohtia noudattaen ja tulokset totuudenmukaisesti ja rehellisesti esittäen. Kokeellisen työn tulokset ovat esitetty niin, kuin ne ovat. Tuloksista on jätetty kuvaamatta ainoastaan ne, jotka ovat tulostasoltaan olleet niin matalia (kemiluminesenssiarvot kasvutekijäaktiivisuuskokeissa) tai korkeita (kynnysarvokierrokset qPCR-kokeissa), ettei niitä ole voinut pitää luotettavina.

Tulosten luotettavuutta tukee myös se, että kahdella eri menetelmällä tehdyt kokeet ovat linjassa toisiinsa nähden; geeniekspressiokokeissa tiloronin todettiin lisäävän gremlinin ilmentymistä, kun taas kasvutekijäaktiivisuuskokeissa tiloroni näytti vähentävän BMP-kasvutekijöiden signalointia. Tämä tulos on looginen, sillä gremlinin tiedetään estävän BMP-kasvutekijöiden toimintaa. Osa opinnäytetyön tuloksista ovat myös samoja, kuin tutkimusryhmän aiemmissa kokeissa.

Lähteet

Anttila, Sisko – Huuskonen, Matti S. – Oksa, Panu – Tossavainen, Antti – Vehmas, Tapio 2006. Asbestisairaudet Suomessa. Suomen lääkärilehti (61) 39. 3961–3966. Luetavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.fimnet.fi.ezproxy.metropolia.fi/cl/laakarilehti/pdf/2006/SLL392006-3961.pdf>>. Luettu 30.3.2015.

Assessment of Nucleic Acid Purity. T042 – Technical Bulletin. NanoDrop Spectrophotometers. Wilmington, Delaware USA: Thermo Fisher Scientific.

ATCCa. MSTO-211H (ATCC® CRL-2081™). Verkkodokumentti. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2081.aspx?geo_country=fi>. Luettu 13.10.2015.

ATCCb. NCI-H2052 [H2052] (ATCC® CRL-5915™). Verkkodokumentti. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-5915.aspx?geo_country=fi>. Luettu 13.10.2015.

Bioluminescent Reporter Gene Assays. 2015. Protocols & Applications Guide. Rev. 4/15. Promega Corporation.

DSMZ. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Verkkodokumentti. <<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-596.html>>. Luettu 13.10.2015.

Dual-Luciferase Reporter Assay System. 2011. Instructions for Use of Products E1910 and E1960. Technical Manual. Rev. 6/11. Madison, USA: Promega Corporation.

Duodecim. Terveyskirjasto. Lääketieteen sanasto.

Dötsch, Jörg – Schoof, Ellen – Rascher, Wolfgang 2005. Quantitative TaqMan Real-Time PCR. Teoksessa Rapley, Ralph – Walker, John M. (toim.): Medical BioMethods Handbook. Torowa, New Jersey: Humana Press. 305 –313.

Freshney, R. Ian 2005. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

FuGENE HD Transfection Reagent. 2013. Instructions for Use of Products E2311 and E2312. Technical Manual. Rev. 2/13. Madison, USA: Promega Corporation.

Hiltunen, Mikko. Translationaalinen tutkimus, mitä, miksi, miten? Itä-Suomen yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.uef.fi/documents/1707279/2567868/2012+Mikko+Hiltunen-Translationaalinen+tutkimus,%20mit%C3%A4,%20miksi,%20miten.pdf/05d54023-50c0-44ca-a19b-526e0ed8ec75>> Luettu 1.2.2015.

Huoponen, Kirsi – Orpana, Arto 2006. Geeni- ja kromosomimuutosten laboratoriodiagnostiikka. Geenitestauksen menetelmiä. Polymeraasiketjureaktio eli PCR. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim. 271–272.

iScript cDNA Synthesis Kit. Pakkausohje. Bio-Rad Laboratories, Inc.

iQ Supermix. Pakkausohje. Bio-Rad Laboratories, Inc.

Koli, Katri – Myllärniemi, Marjukka – Vuorinen, Kirsi – Salmenkivi, Kaisa – Ryyänen, Merja – Kinnula, Vuokko – Keski-Oja, Jorma 2006. Uusi mekanistinen näkökulma idiopaattiseen keuhkofibroosiin: BMP-4:n estäjän gremlinin voimakas indusoituminen. *Duodecim* 122. 1713–1714. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo95884.pdf>>. Luettu 1.2.2015.

Koli, Katri 2006. Koli Lab. Translational cancer biology research program. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://research.med.helsinki.fi/cancerbio/koli/Index.html#>>. Luettu 1.2.2015.

Koli, Katri 2015a. Dosentti. Biomedicum, KoliLab. Helsinki. Sähköinen tiedonanto. 2.2.2015.

Koli, Katri 2015b. Dosentti. Biomedicum, KoliLab. Helsinki. Sähköinen tiedonanto. 30.3.2015.

KOTUS Kielitoimiston sanakirja 2014. Helsinki: Kotimaisten kielten tutkimuskeskus ja Kielikone.

Kropsu, Päivi – Oksa, Panu – Ylioinas, Pihla 2012. Asbestisairaudet eivät ole loppumas-sa – asbestipurkajapotilaan tapaus. *Suomen lääkäri* 67 (8). 601–605. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.fimnet.fi/ezproxy.metropolia.fi/cl/laakarilehti/pdf/2012/SLL82012-601.pdf>>. Luettu 30.3.2015.

Kuula, Arja (toim.) 2011. Tutkimusetiikka. Hyvä tieteellinen käytäntö. Tampere: Vastapaino.

Leppäranta, Outi – Tikkanen, Jussi M. – Bespalov, Maxim M. – Koli, Katri – Myllärniemi, Marjukka 2013a. Molekyyliuonnasta lääkekandidaatti idiopaattisen keuhkofibroosin hoitoon. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 129 (3). 255–256. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/kokoelmat;jsessionid=0A1A7E9A75234B260CDEAD830E103558?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&doAsUserId=zwfvumztrxbow&Article_WAR_DL6_Articleportlet_doAsUserId=zwfvumztrxbow&Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=uusinnumero&Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo10771>. Luettu 1.2.2015.

Leppäranta, Outi – Tikkanen, Jussi M. – Bespalov, Maxim M. – Koli, Katri – Myllärniemi, Marjukka 2013b. Bone Morphogenetic Protein-Inducer Tilorone Identified by High-Throughput Screening Is Antifibrotic In Vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48. 448–455. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1165/rcmb.2012-0201OC>>. Luettu 30.3.2015.

Louhiala, Pekka – Pelkonen, Risto 2002. Ihminen lääketieteellisen tutkimuksen kohteena. Tieteellisen tutkimuksen laadun etiikka. Teoksessa Karjalainen, Sakari – Launis, Veikko – Pelkonen, Risto – Pietarinen, Juhani (toim.): *Tutkijan eettiset valinnat*. Helsinki: Gaudeamus. 127–128.

Lung factor 2011. Verkkodokumentti. <http://www.lungfactor.fi/?page_id=38>. Luettu 1.2.2015.

MOT Kielitoimiston sanakirja 8.5c. MOT sanakirjasto. Helsinki: Kotimaisten kielten tutkimuskeskus ja Kielikone.

Mustajoki, Pertti 2014. Keuhkofibroosi (keuhkojen sidekudoistuminen). Terveyskirjasto. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00644>. Luettu 1.2.2015.

NIH. 2011. National Heart, Lung, and Blood Institute. What Are Asbestos-Related Lung Diseases? Verkkodokumentti. <<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asb>>. Luettu 13.10.2015.

Niiniluoto, Ilkka 2002. Tieteen tunnuspiirteet. Tiede itseään korjaavana järjestelmänä. Teoksessa Karjalainen, Sakari – Launis, Veikko – Pelkonen, Risto – Pietarinen, Juhani (toim.): Tutkijan eettiset valinnat. Helsinki: Gaudeamus. 37–38.

Nordman, Henrik – Tuppurainen, Matti – Vehmas, Tapio – Wolff, Henrik 2009. Pöly-keuhkosairauksien diagnostiikka kaipaa tarkentamista. Suomen lääkärilehti 64 (12). 1152–1155. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.fimnet.fi.ezproxy.metropolia.fi/cl/laakarilehti/pdf/2009/SLL122009-1152.pdf>>. Luettu 30.3.2015.

Perinnöllisyyslääketiede 2006. Sanasto. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim.

Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology. 2012. RNeasy Mini Handbook. Pakkausohje. Rev. 6/12. Qiagen.

Sankila, Risto – Pukkala, Eero 2009. Muut syövät. Mesotelioma. Terveyskirjasto. Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00016#s6>. Luettu 1.2.2015.

Solunetti. 2006. Solubiologia. Soluviljely. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/>. Luettu 7.10.2015.

Sugden, David 2005. Quantitative PCR. Teoksessa Rapley, Ralph – Walker, John M. (toim.): Medical BioMethods Handbook. Torowa, New Jersey: Humana Press. 327–329.

Tamminen, JA – Parviainen, V – Rönty, M – Wohl, AP – Murray, L – Joenväärä, S – Varjosalo, M – Leppäranta, O – Ritvos, O – Sengle, G – Renkonen, R – Myllärniemi, M – Koli, K 2013. Gremlin-1 associates with fibrillin microfibrils in vivo and regulates meso-thelioma cell survival through transcription factor slug. Oncogenesis. 1–13. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759128/pdf/oncsis201329a.pdf>>. Luettu 30.3.2015.

Tamminen, Jenni 2014. TGF- β family signaling in the regulation of cell plasticity in lung cells and mesothelioma. Academic dissertation. Faculty of Medicine. University of Helsinki. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa: <<file:///C:/Users/Omistaja/Downloads/TGF%CE%B2fami.pdf>>. Luettu 30.3.2015.

Transfection. 2013. Protocols & Applications Guide. Rev. 12/13. Promega Corporation.

Tymidiinikinaasi. 2007. Ohjekirja. Pirkanmaa ja Kanta-Häme. Fimlab Laboratoriot. Verkkodokumentti. <http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;se-tid=6249;id=11571>. Luettu 28.10.2015.

Tähtäimessä tehokas hoito keuhkofibroosiin ja mesotelioomaan. 2006. Lääketieteellinen tiedekunta. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. <http://www.med.helsinki.fi/uutiset/2013/20131014_koli.htm>. Luettu 1.2.2015.

Wikimedia Commons. 2015. File:Taqman.png. Verkkodokumentti. <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Taqman.png>>. Luettu 13.10.2015.